

# DE QUELQUES FLUORONES

Leurs propriétés chimiques et biologiques,  
leur application à la localisation  
des médicaments antimoniés dans l'organisme

---

## THÈSE

Présentée et publiquement soutenue  
devant la Faculté de Pharmacie de Montpellier

Le 12 Mars 1945

par

Louis KHAU VAN KIEN

né à Travinh (Cochinchine)

Pharmacien

Diplômé de Bromatologie,

Minéralogie

et

Biologie générale

POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

---

JURY

{ MM. ASTRUC, Doyen de la Faculté de Pharmacie *Président*  
TURCHINI, Professeur à la Faculté de Médecine  
CASTEL, Chargé de Cours à la Faculté de Pharmacie } *Assesseurs*

---

1945

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG  
MONTPELLIER



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41555601\\_0033](https://archive.org/details/IA41555601_0033)

**KHAU VAN KIEN (Louis)**

De quelques fluorones. Leurs propriétés chimiques et biologiques, leur application à la localisation des médicaments antimonisés dans l'organisme. — *Montpellier, Imprimerie des Dernières Nouvelles de Strasbourg*, 1945, in-8°, 104 pages. (*Thèse Pharmacie Etat, Montpellier*, 1945, n° 6.)

**KHAU VAN KIEN (Louis)**

De quelques fluorones. Leurs propriétés chimiques et biologiques, leur application à la localisation des médicaments antimonisés dans l'organisme. — *Montpellier, Imprimerie des Dernières Nouvelles de Strasbourg*, 1945, in-8°, 104 pages. (*Thèse Pharmacie Etat, Montpellier*, 1945, n° 6.)

**KHAU VAN KIEN (Louis)**

De quelques fluorones. Leurs propriétés chimiques et biologiques, leur application à la localisation des médicaments antimonisés dans l'organisme. — *Montpellier, Imprimerie des Dernières Nouvelles de Strasbourg*, 1945, in-8°, 104 pages. (*Thèse Pharmacie Etat, Montpellier*, 1945, n° 6.)

**KHAU VAN KIEN (Louis)**

De quelques fluorones. Leurs propriétés chimiques et biologiques, leur application à la localisation des médicaments antimonisés dans l'organisme. — *Montpellier, Imprimerie des Dernières Nouvelles de Strasbourg*, 1945, in-8°, 104 pages. (*Thèse Pharmacie Etat, Montpellier*, 1945, n° 6.)



## DE QUELQUES FLUORONES

Leurs propriétés chimiques et biologiques,  
leur application à la localisation  
des médicaments antimoniés dans l'organisme



# DE QUELQUES FLUORONES

Leurs propriétés chimiques et biologiques,  
leur application à la localisation  
des médicaments antimoniés dans l'organisme

---

## THÈSE

Présentée et publiquement soutenue  
devant la Faculté de Pharmacie de Montpellier

Le Mars 1945

par

Louis KHAU VAN KIEN

né à Travinh (Cochinchine)

Pharmacien  
Diplômé de Bromatologie,  
Minéralogie  
et  
Biologie générale

POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

---

JURY

{ MM. ASTRUC, Doyen de la Faculté de Pharmacie *Président*  
TURCHINI, Professeur à la Faculté de Médecine  
CASTEL, Chargé de Cours à la Faculté de Pharmacie } *Assesseurs*

---

1945

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG  
MONTPELLIER

# Faculté de Pharmacie de Montpellier

## ADMINISTRATION

|                                 |                    |
|---------------------------------|--------------------|
| MM.                             |                    |
| A. ASTRUC (O. ✱, I. P. ☉) ..... | <i>Doyen.</i>      |
| E. CANALS (I. P. ☉) .....       | <i>Assesseur.</i>  |
| TOURRETTE (I. P. ☉) .....       | <i>Secrétaire.</i> |

## PROFESSEURS

|                                     |                                                   |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------|
| MM.                                 |                                                   |
| A. ASTRUC (O. ✱, I. P. ☉) .....     | <i>Pharmacie galénique et pharmacodynamie</i>     |
| C. HOLLANDE (I. P. ☉) .....         | <i>Zoologie et Microbiologie.</i>                 |
| A. JUILLET (I. P. ☉) .....          | <i>Botanique et Matière médicale.</i>             |
| E. CANALS (I. P. ☉) .....           | <i>Physique.</i>                                  |
| P. JAULMES (A. ☉) .....             | <i>Analyse et Toxicologie.</i>                    |
| R. DOLIQUE (A. ☉) .....             | <i>Chimie minérale et Pharmacie industrielle.</i> |
| J. GIROUX, professeur sans chaire.. | <i>Pharmacodynamie</i>                            |
| R. GRANGER, chargé du cours ....    | <i>Chimie organique.</i>                          |
| P. CASTEL (A. ☉) chargé du cours..  | <i>Pharmacie chimique.</i>                        |

## DOYEN HONORAIRE

M. G. MASSOL (✱, I. P. ☉)

## PROFESSEURS HONORAIRES

|                                                             |  |
|-------------------------------------------------------------|--|
| MM.                                                         |  |
| M. MOUSSERON, (A. ☉), professeur à la Faculté des Sciences. |  |
| A. FAUCON (O. ✱, I. P. ☉, C. ✱, G. O. ✱)                    |  |

## CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

|                            |                                    |
|----------------------------|------------------------------------|
| MM.                        |                                    |
| A. JUILLET (I. P. ☉) ..... | <i>Botanique.</i>                  |
| E. CANALS (I. P. ☉) .....  | <i>Hydrologie.</i>                 |
| P. JAULMES (A. ☉) .....    | <i>Toxicologie.</i>                |
| R. DOLIQUE (A. ☉) .....    | <i>Pharmacie industrielle.</i>     |
| P. MONNIER .....           | <i>Chimie biologique</i>           |
| J. GIROUX .....            | <i>Physiologie.</i>                |
| J. SUSPLUGAS .....         | <i>Cryptogamie et Zoologie.</i>    |
| L. ASTRUC .....            | <i>Législation pharmaceutique.</i> |

## CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

|                          |                             |
|--------------------------|-----------------------------|
| MM.                      |                             |
| L. FARRÉ (I. P. ☉) ..... | <i>Chimie et Pharmacie.</i> |
| J. SUSPLUGAS .....       | <i>Histoire naturelle.</i>  |
| R. MARIGNAN .....        | <i>Chimie.</i>              |

NOTA. — La Faculté de Pharmacie n'accepte la responsabilité d'aucune des opinions émises par les candidats dans les Thèses ou Synthèses qui sont présentées.



A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Doyen A. ASTRUC,  
Doyen de la Faculté de Pharmacie,  
Professeur de Pharmacie Galénique et de Pharmacodynamie,  
Correspondant National de l'Académie de Médecine,  
Officier de la Légion d'Honneur.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. TURCHINI,  
Professeur d'Histologie à la Faculté de Médecine,  
Chevalier de la Légion d'Honneur.

A MONSIEUR P. CASTEL,  
Chargé de la Chaire de Pharmacie chimique à la Faculté  
de Pharmacie.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR HONORAIRE A. FAUCON,  
Officier de la Légion d'Honneur.

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE  
ET DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE MONTPELLIER.

AU MINISTÈRE DES COLONIES,  
Faible témoignage de ma gratitude.

A MONSIEUR LE DOYEN MATHIAS.

A MON PAYS NATAL,

A MA FEMME ET A MES ENFANTS,

A TOUS LES MIENS,

A TOUS MES AMIS.

## INTRODUCTION

Quand on examine les possibilités et les limites de l'histo-chimie actuelle, on est frappé par le fait qu'il reste des domaines non encore accessibles à l'analyse histochimique et où les tentatives effectuées jusqu'à présent n'ont pas encore donné de résultats bien fructueux. Il existe cependant certains domaines où les résultats histochimiques dépassent les espérances. Prenons l'exemple de la détection du fer par la réaction du bleu de Prusse dans les cellules. Cette dernière offre une sensibilité remarquable, elle décèle  $2,5 \times 10^{-7} \gamma$  de fer, or l'analyse spectrale considérée jusqu'à ce jour comme possédant une sensibilité extrême, ne décèle que  $0,1 \gamma$  à  $0,01 \gamma$  de substance. On voit que la réaction histochimique est 50.000 fois plus sensible. Les réactions de ce genre sont peu nombreuses. Cependant la chimie analytique, la microchimie s'enrichissent constamment de réactions nouvelles et il en est parmi elles qui sont susceptibles d'être appliquées à l'histochimie. Cette application ne sera possible que si elles sont assez sensibles, c'est-à-dire capables de déceler des quantités de substances extraordinairement réduites qui se trouvent dans les cellules et que les produits formés aient une intensité de coloration suffisante pour être visible et permettre de suivre les aspects du métabolisme de la substance étudiée au sein même des tissus.

De nombreux métaux, autres que le fer, ont pu être étudiés, notamment des éléments minéraux jouant un rôle important dans le métabolisme normal de l'organisme comme le calcium, le phosphore, le silicium etc. On a cherché, d'autre part, à mettre en évidence un certain nombre d'éléments ou

de minéraux lourds étrangers au métabolisme et introduits dans l'organisme dans un but thérapeutique ou bien accidentellement. C'est ainsi qu'on a pu localiser histochimiquement l'or, le nickel, le zinc, le plomb, le manganèse, le mercure, l'arsenic, le bismuth, et suivre le sort de certains de ces corps dans l'organisme. Pierre CASTEL, dans sa thèse : « Contribution à l'étude histochimique de la localisation de certaines substances médicamenteuses ou toxiques (Arsenic et Bismuth) » (16), a su montrer l'intérêt d'une telle étude, et fait ressortir l'utilité des localisations histochimiques de ces substances dans les investigations pharmacodynamiques, tant au point de vue pharmaceutique qu'au point de vue thérapeutique et toxicologique. Il a montré surtout les conséquences pratiques qu'on peut tirer de cette étude. Elle peut soit aider le clinicien en lui donnant la durée de la rétention de certains médicaments, et expliquer la présence de réactions toxiques tardives, soit lui permettre d'établir un diagnostic des accidents dus à certaines thérapeutiques, soit apporter à la médecine légale des preuves tangibles d'intoxication.

A côté de l'arsenic, du bismuth, dont l'étude histochimique a pu être réalisée, l'antimoine, médicament de haute valeur dans la lutte antiparasitaire tropicale, mais doué de toxicité, n'a pas encore été étudié. Cet élément, bien que présentant des caractères généraux très voisins de l'arsenic et du bismuth, en diffère par un état électro-positif intermédiaire et par des réactions qualitatives et quantitatives moins nettes. L'antimoine semble « être réfractaire aux réactifs chimiques et ne vouloir se livrer qu'à demi » (33). Cette particularité a empêché pendant longtemps son étude histochimique. En effet quand on parcourt la liste des réactifs de l'antimoine, on voit qu'il existe un très grand nombre de réactifs, mais qu'aucun n'est vraiment spécifique, ce qui montre que la recherche de petites quantités d'antimoine n'est pas chose facile. On a recherché récemment des réactifs organiques susceptibles de déceler l'antimoine. Les complexes qu'ils

forment avec les éléments minéraux sont peu solubles et, dans quelques cas, fortement colorés. Le pyrogallol proposé par FEIGL donne une réaction sensible de l'antimoine, mais non colorée. Des chercheurs, essayant de vérifier l'hypothèse « Causse Feigl » selon laquelle seuls les corps organiques possédant deux hydroxyles en ortho réagiraient avec l'antimoine pour donner des sels d'antimonyle insolubles, ont utilisé le pyrogallol et ses 2 isomères : la phloroglucine et l'oxyhydroquinone. En préparant ce dernier corps, R. DUCKERT (30) découvrit une « impureté rouge », qui, en milieu acide, donne avec l'antimoine une réaction spécifique. Il réussit bientôt à isoler cette impureté et à l'identifier à la 9 méthyl-2, 3, 7 trihydroxy 6 fluorone, dont la synthèse et la description ont été faites par LIEBERMANN et LINDENBAUM en 1904. Il en fit alors le réactif spécifique de l'antimoine. Cette fluorone possède deux hydroxyles en ortho et se montre spécifique au pH 4. Une étude analytique de CL. P. BLANCPAIN (8) en 1937 a permis de l'utiliser pour l'analyse qualitative et même pondérale de l'antimoine. En 1940, Mlle LIÉVIN (58) employa cette fluorone avec succès à la recherche de l'antimoine au moyen de stilliréactions. Depuis 1942 nous avons repris cette question. Nous avons réalisé la préparation pratique, en partant de l'hydroquinone, de différentes fluorones, en particulier de la 9-phényl-2, 3, 7, trihydroxy, 6-fluorone. Nous avons étudié leurs réactions vis-à-vis des substances organiques comme les sucres et les acides nucléiques. Enfin nous les avons employées pour la première fois dans des techniques histochimiques entièrement nouvelles pour l'étude de la localisation de médicaments antimoniés dans l'organisme (17). Les résultats et leur interprétation seront plus longuement développés au cours de notre travail.

Nous ne dissimulerons pas les difficultés de notre étude, car l'histochimie est une science entièrement nouvelle et encore peu évoluée. On ne peut réaliser de progrès et obtenir des résultats importants sans le secours d'autres sciences.

Liée à la chimie analytique d'où elle tire ses réactions, l'histochemie essaye de caractériser rationnellement des substances avec des réactifs sensibles et spécifiques, de formules connues et de mode d'action connue. Elle essaye de faire l'image chimique des substances et de leurs modifications, surtout d'expliquer et d'interpréter certaines réactions ou certains phénomènes chimiques. Tout cela est rendu difficile par le cadre étroit et fragile de la cellule, où il faut caractériser « in situ » les substances dissoutes ou fixées sur un support organique. L'histochemie doit faire appel à l'histologie et aussi à l'histophysiologie, dont elle représente un degré plus élevé dans l'évolution des sciences histophysiologiques (92). Elle doit aussi se familiariser avec des notions tout à fait nouvelles touchant les rapports et les variations de constitution chimique ou physique de la cellule, comme la membrane, le cytoplasme, le noyau au cours des métabolismes normaux ou expérimentaux, afin d'en tenir compte au cours des opérations techniques.

Ces dernières doivent être améliorées et adaptées à chaque circonstance. Dans les localisations de substances médicamenteuses d'origine exogène la technique parfaite doit empêcher toute diffusion de substance : 1° en préconisant, soit des fixations à l'aide de vapeurs, soit des liquides fixateurs ne dissolvant pas les substances cherchées ou leurs combinaisons cellulaires ; 2° en favorisant la pénétration rapide du réactif précipitant, par le choix d'un véhicule très pénétrant et peu toxique. Des études dans ce sens permettront à notre avis de réaliser de réels progrès en donnant des localisations histochimiques précises et plus complètes. Aussi avons-nous essayé de nous engager dans cette voie, quelques bons résultats ont récompensé nos efforts, ce que nous avons obtenu est peu de chose, de vastes terrains restent encore à défricher, nous espérons cependant que notre modeste travail sera utile à ceux qui aborderont des questions analogues.

C'est pour nous une grande joie de pouvoir exprimer ici notre reconnaissance aux Maîtres éminents de l'Université de Montpellier, qui nous ont permis de nous initier à la recherche scientifique. C'est avec émotion que nous les remercions de nous avoir dispensé leur précieux enseignement, de nous avoir guidé avec bonté au cours de plusieurs années d'études, et enfin de nous avoir montré la voie à suivre, et soutenu du réconfort de leur sympathie.

Notre gratitude va tout d'abord à Monsieur le Professeur CASTEL, qui a inspiré cette thèse, et qui nous a témoigné, en nous accueillant dans son laboratoire et en nous associant à une partie de ses recherches, une estime qui fut pour nous le plus précieux stimulant. Ses directives et ses conseils dans l'étude histochimique de l'antimoine, agent d'une médication dont beaucoup de pays tropicaux sont tributaires, nous ont été d'autant plus précieux qu'il est dans notre Université à peu près le seul à s'occuper de ces questions. C'est avec une réelle émotion que nous tenons à l'assurer de notre profonde gratitude et de notre fidèle attachement.

Monsieur le Professeur Jean TURCHINI, de la Faculté de Médecine, qui a dirigé et permis de mener à bonne fin la partie histologique de notre travail, nous a réservé, pour cela, dans son Laboratoire un accueil chaleureux et témoigné une bonté paternelle. L'atmosphère d'activité que son propre exemple y entretient malgré les difficultés de la période présente nous a toujours séduit. Qu'il nous permette de lui exprimer notre respectueux hommage de gratitude.

Monsieur le Doyen ASTRUC enfin, qui nous a toujours témoigné un bienveillant intérêt et qui, aujourd'hui encore, nous fait l'immense honneur de présider notre jury de thèse et de sanctionner ainsi ce travail de sa haute autorité, nous accorde une nouvelle preuve de sa sympathie dont nous

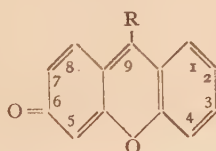
mesurons tout le prix. Qu'il veuille bien nous permettre de lui exprimer ici notre profonde et respectueuse reconnaissance.

Nous tenons à remercier aussi tous les Maîtres de l'Université, et en particulier les Professeurs MOUSSERON, JAULMES et GIROUX qui se sont toujours intéressés à nous, ainsi que tous nos camarades de Laboratoire, dont les marques d'amitié laisseront en nous un inoubliable souvenir.

## PREMIÈRE PARTIE

### DE QUELQUES FLUORONES

Les fluorones sont des composés organiques, dont la synthèse a été réalisée depuis un certain nombre d'années. La phloroglucine et ses homologues réagissent à la fois sous la forme cétonique et sous la forme phénolique et conduisent aux fluorones (83), combinaisons voisines des xanthydrols et représentées par la formule suivante :



Ces composés sont la base fondamentale de matières colorantes comme les fluoescéines, les rosamines, les rhodamines. Certaines fluorones sont elles-mêmes des matières colorantes présentant une fluorescence marquée.

Ces dernières années, l'attention des chimistes a été attirée par les dérivés des homologues de la phloroglucine, comme le pyrogallol, l'oxyhydroquinone. H. CAUSSE et C. BAYARD (19) avaient remarqué que les polyphénols en ortho donnent des dérivés antimonyles insolubles. Cette hypothèse fut vérifiée par FEIGL (34) qui admet que la fixation de l'antimoine est due au caractère non saturé du groupe phényl. Différents travaux sur les polyphénols et les acides phénols, effectués par CHRISTIANSEN (22) ; GUTZEIT, WEIBEL et R. DUCKERT (40), montrent que, sauf l'oxyhydroquinone qui ne donne pas de

composé insoluble avec l'antimoine, presque tous les composés phénoliques à fonction OH en ortho vérifient l'hypothèse « Causse-Feigl » (8). En particulier, un dérivé de l'oxyhydroquinone retrouvé par R. DUCKERT et identifié comme étant la 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone, s'est révélé comme un réactif spécifique de l'antimoine au pH 4. Des recherches analytiques de CL. P. BLANCPAIN (8) ont permis d'envisager son emploi dans les méthodes générales d'analyse qualitative et quantitative de l'antimoine. Mlle LIÉVIN dernièrement l'a employé dans la recherche de l'antimoine au moyen des stilliréactions. Voici sa conclusion : « La réaction de la 9 méthyl trihydroxyfluorone est élégante, réalisable à la fois sur papier filtre et en godet, quelle que soit la valence de l'antimoine; extrêmement sélective, elle paraît être la meilleure des réactions étudiées. »

Devant les résultats intéressants obtenus par l'emploi de ce corps, nous avons voulu voir si d'autres fluorones de constitution voisine pouvaient donner des résultats analogues. Il s'agit d'introduire d'autres radicaux et d'autres fonctions sur le carbone 9 ou d'autres éléments sur le carbone 6, afin d'obtenir des fluorones ou des dérivés de fluorones possédant encore leur oxhydrile OH en ortho, et qui puissent donner avec l'antimoine des complexes insolubles plus lourds et plus colorés permettant : soit une bonne détermination qualitative et quantitative de l'antimoine, soit une recherche plus sensible par les stilliréactions; ou encore d'obtenir un réactif qui nous permettrait une localisation histochimique de cet élément dans l'organisme; cette localisation demande au réactif des qualités très difficiles à réaliser, car la réaction doit se produire au sein d'un protoplasme cellulaire colloïdal.

## I. — Préparation des Fluorones

Théoriquement on prépare la 9 méthyl 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone selon le schéma proposé par R. DUCKERT (30). On

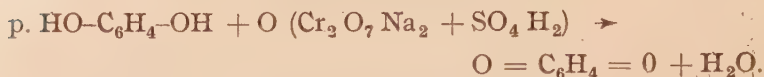
part de l'hydroquinone, qui oxydée donne la quinone. Cette dernière en présence d'anhydride acétique en milieu sulfurique donne le dérivé triacétylé qui peut conduire à la fluorone par deux modes de préparation. La première consiste à préparer l'oxyhydroquinone pure et à la condenser avec l'acétaldéhyde ou la paralaldéhyde. La deuxième est proposée par R. DUCKERT : on saponifie le dérivé triacétylé et on condense directement l'oxyhydroquinone libérée avec l'acétaldéhyde en milieu sulfurique.

Selon le schéma théorique, la préparation de la 9 méthyl-2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone est assez difficile à réaliser. Il nous a paru intéressant d'apporter une préparation pratique de ce corps, ainsi que d'autres fluorones, qui ne se trouvent pas dans le commerce, ainsi que les produits immédiats qui servent à leur préparation. Mlle M. LIEVIN, a donné une préparation de fluorone en partant de la quinone. Cette préparation serait suffisante, si la quinone n'était pas un corps extrêmement altérable, on ne peut en effet la trouver à l'état pur. Plusieurs échantillons du commerce que nous avons commandés, bien qu'ils aient été convenablement bouchés et conservés en flacon jaune à l'abri de la lumière, ne possédaient pas les caractères physiques et chimiques satisfaisants. Ils étaient généralement altérés et colorés en teinte plus ou moins verdâtre par formation de quinhhydrone très difficile à séparer de la quinone. Nous avons dû chercher une méthode pratique de préparation de quinone exempte de quinhhydrone.

### Préparation de la Quinone

Après différents essais avec des méthodes diverses à partir du benzène, de l'aniline, de l'hydroquinone indiquées par NIETSKY (70) et d'autres chimistes, comme GATTERMAN (37), nous avons choisi la méthode proposée par E. B. VLIET, vérifiée par Roger ADAMS et S. E. DREGER (84, 87). Cette méthode nous a donné toute satisfaction : le produit obtenu

est pur et le rendement au laboratoire est très bon, aussi reproduisons-nous ici le mode opératoire basé sur la réaction suivante :



« Dans un bécher de 2 litres et demi, dissoudre 100 grammes (0, mol 91) d'hydroquinone dans 2 litres d'eau chauffée à 50° environ. Le solide étant complètement dissous, refroidir à 20 degrés, ajouter lentement 100 g (54 cm<sup>3</sup>) d'acide sulfurique concentré, refroidir de nouveau le mélange à 20 degrés. (Si on part d'une hydroquinone impure, un précipité noir, visqueux apparaît généralement après addition d'acide sulfurique à la solution d'hydroquinone, on l'éliminera par filtration sur un filtre ordinaire avant de commencer la réaction d'oxydation).

D'autre part, préparer la solution concentrée de bichromate de sodium technique en dissolvant 140 g de ce sel (0,47 mol) dans 65 cm<sup>3</sup> d'eau, (lorsqu'on emploie du bichromate de soude technique il faut filtrer la solution à la trompe pour éliminer toutes les impuretés insolubles, avant de l'ajouter à l'hydroquinone).

Ajouter peu à peu cette solution à la solution d'hydroquinone tout en agitant mécaniquement, et refroidir de façon que la température ne s'élève jamais au-dessus de 30°. Pendant l'oxydation le mélange devient extrêmement épais, aussi faut-il employer un agitateur qui brasse bien la totalité de la masse en frôlant le fond et les côtés du bécher. Il se forme tout d'abord un précipité noir verdâtre, mais par addition du reste de la solution de bichromate de sodium, la coloration vire au vert jaunâtre. Dès que cette coloration persiste, (un léger excès de bichromate de sodium ne gêne pas) la réaction est terminée. Cette addition demande de 30 à 45 minutes et il faut de 90 cm<sup>3</sup> à 110 cm<sup>3</sup> de bichromate. Refroidir le mélange aux environs de 10 degrés et filtrer à la trompe. Presser les cristaux sur le filtre pour éliminer

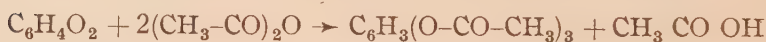
l'eau autant que possible. Extraire deux fois le filtrat avec 150 cm<sup>3</sup> de benzène, chaque fois. Placer le précipité de quinone dans un bécher d'un litre et ajouter 500 cm<sup>3</sup> de benzène (y compris les 300 cm<sup>3</sup> qui ont servi à extraire le filtrat). Chauffer alors le mélange en agitant sur le bain-marie, et dès que la quinone est dissoute, décanter la couche benzénique dans un autre bécher. La sécher tandis qu'elle est encore chaude en l'agitant quelque temps avec un peu de chlorure de calcium; filtrer au moyen d'un entonnoir ordinaire directement dans un ballon à distiller d'un litre avant que la solution se refroidisse. Une certaine quantité de quinone ne s'est pas dissoute dans les 500 cm<sup>3</sup> de benzène, aussi extraira-t-on le résidu une deuxième fois avec 100 cm<sup>3</sup> environ de benzène. On séchera comme ci-dessus et ce filtrat sera réuni au premier. Pendant toutes ces extractions (au laboratoire il vaut mieux opérer sur les quantités indiquées et faire plusieurs opérations consécutives, du moins en ce qui concerne la réaction d'oxydation, mais les extractions au benzène pourront se faire sur le tout en une seule fois), le benzène ne doit pas être bouillant, car il en résulterait une volatilisation importante de la quinone. Sur le ballon à distiller on adapte alors un réfrigérant descendant et on chasse le benzène. Dès que la quinone commence à se séparer, transvaser le résidu du ballon dans un bécher et refroidir dans la glace. Séparer le précipité par filtration à la trompe et l'étaler pendant quelque temps pour le sécher. Le produit est jaune, il pèse de 75 à 80 g (76 à 81 % de la quantité théorique). La quinone ainsi obtenue gardera sa couleur jaune pourvu qu'elle soit mise à l'abri de la lumière. Le benzène distillé est jaune et contient un peu de quinone. On pourra le réserver ainsi que le benzène provenant de la filtration finale des cristaux de quinone pour une opération ultérieure dont le rendement se trouvera élevé à 85-92 % de la quantité théorique. On peut également obtenir de bons rendements en quinone en opérant de la manière suivante : « Dans un bécher de 3 litres, mélanger 1500 cm<sup>3</sup> d'eau,

465 g d'acide sulfurique concentré, 300 g (2,7 mol) d'hydroquinone, refroidir à zéro degré et ajouter 330 g (1,1 mol) de bichromate de sodium pulvérisé, en maintenant la température aux environs de 5 degrés. Cette méthode prend plus de temps et est plus difficile à conduire que le procédé précédent. »

### Préparation du Triacétate d'Oxyhydroquinone

La deuxième phase de notre préparation se continue par la méthode de J. THIEL (90) dont le mode opératoire a été signalé par Cl. P. BLANCPAIN et Mlle LIÉVIN. Nous donnons ici la méthode que nous avons suivie pour avoir une idée d'ensemble sur la préparation des fluorones.

La préparation du triacétate d'oxyhydroquinone en partant de la quinone est basée sur la réaction suivante :



La réaction se fait en présence d'acide sulfurique à la température la plus basse possible.

75 g de quinone préparée par nous, sont ajoutés par petites portions dans un mélange refroidi de 125 g d'anhydride acétique pur et sec, et 5 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique concentré D = 1,840. La quinone se dissout en donnant très vite une forte élévation de température, on refroidit et on maintient la température au voisinage de 40 à 50 degrés tout en versant la quinone. Quand celle-ci est transformée en triacétate, il n'y a plus d'élévation de température, on laisse refroidir pendant un certain temps. La solution jaune or devient alors jaune pâle, ayant l'aspect de beurre fondu. On coule la masse liquide dans un grand bécber d'un litre contenant de l'eau distillée. En agitant il se forme un précipité blanc que surmonte un liquide légèrement jaunâtre; on lave par décantation à plusieurs reprises et le produit essoré est recristallisé dans l'alcool éthylique ou méthylique jusqu'à obtention d'un produit pur.

Nous avons obtenu un produit entièrement blanc et cristallisé. Le point de fusion, pris en température montante est de 97°, ce chiffre est très proche du point de fusion donné par J. THIELE :  $F = 96,5-97$ . Le rendement est excellent, de l'ordre de 80 % indiqué par l'auteur.

Ce produit décolore le permanganate et donne les différentes réactions colorées signalées par l'auteur, il présente l'avantage d'être stable.

Le triacétate obtenu avec la quinone du commerce, après de nombreuses cristallisations, n'est pas blanc, mais grisâtre et le point de fusion est bien plus bas. ( $F$  sensiblement égal à 94°).

Le triacétate d'oxyhydroquinone pur est le produit fondamental servant à la préparation des fluorones. Il peut sous l'action de l'acide sulfurique donner l'oxyhydroquinone; ce corps est très oxydable et difficile à isoler à l'état pur, aussi nous préconisons l'amendement apporté par R. DUCKERT (30) en ne séparant pas l'oxyhydroquinone, mais en saponifiant le triacétate de façon à obtenir juste au moment voulu une solution fraîche d'oxyhydroquinone que l'on condense avec les aldéhydes choisis pour donner naissance à des fluorones.

### **Préparation de la 9 Méthyl, 2, 3, 7 Trihydroxy, 6 Fluorone**

Cette dernière est obtenue par condensation d'une molécule d'oxyhydroquinone libérée en milieu sulfurique et alcoolique, avec une molécule un quart de paraldéhyde. Nous avons suivi la technique de préparation suivante :

40 g de triacétate sont dissous à la température la plus basse dans un mélange de 200 cm<sup>3</sup> d'alcool et 200 cm<sup>3</sup> de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> à 15 %. Quand la dissolution est terminée, on obtient une solution jaune verdâtre qu'on laisse refroidir et dans laquelle on ajoute 20 cm<sup>3</sup> de paraldéhyde; la solution est laissée au repos pendant une heure; on la place ensuite sur une étuve à la température de 40 à 50 degrés; après deux ou trois jours on obtient environ 25 % de sulfate de fluorone

cristallisé, rouge orangé, on filtre et on le purifie par dissolution à reflux dans l'alcool additionné de quelques gouttes d'acide sulfurique; la solution est versée dans l'eau chaude, et la fluorone libre se sépare en un précipité formé d'aiguilles rouge sombre à reflets métalliques.

En opérant, comme Mlle LIÉVIN et Cl. P. BLANCPAIN, en laissant reposer la solution à froid pendant deux ou trois jours, nous avons obtenu un rendement beaucoup plus faible, inférieur à 25 % de sulfate de fluorone cristallisé. La solution filtrée provenant de la séparation du sulfate de fluorone contient encore une proportion très importante de fluorone qu'on peut récupérer en versant cette solution dans un excès d'eau chaude, environ 20 volumes; la fluorone base précipite; on lave à plusieurs reprises par de l'eau bouillante et on purifie par dissolution à reflux dans l'alcool bouillant et reprécipitation par l'eau chaude; on obtient une quantité importante de fluorone qui peut servir à la recherche qualitative de l'antimoine.

Cette fluorone peut être obtenue aussi sans addition de paraldéhyde; nous avons retrouvé fortuitement cette préparation déjà signalée par R. DUCKERT (30); en effet, lorsqu'on saponifie le triacétate d'oxyhydroquinone par l'acide sulfurique en milieu alcoolique, l'acide acétique libéré peut conduire à la formation d'acétaldéhyde, cette dernière, en milieu sulfurique, et au voisinage de 40 à 50° donne un abondant dépôt de la 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone cristallisé c'est-à-dire la fluorone précédente.

### **Préparation de la 9 Phényl, 2, 3, 7 Trihydroxy, 6 Fluorone**

Cette fluorone provient de la condensation de l'oxyhydroquinone avec de l'aldéhyde benzoïque en milieu sulfurique; ce produit est un dérivé du triphénylméthane, tandis que la 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone est un dérivé du diphenyl-méthane.

On l'obtient par la technique de LIEBERMANN et LINDENBAUM en gardant la modification de R. DUCKERT : on saponifie 40 g (deux molécules) de triacétate de trihydroxyquinone correspondant à 20 g d'oxyhydroquinone dans le mélange de 200 cm<sup>3</sup> d'alcool et de 32 g de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> concentré dilué dans 160 cm<sup>3</sup> d'eau; quand tout est dissous à chaud, on ajoute 8 g d'aldéhyde benzoïque et on porte au bain-marie bouillant pendant 5 à 6 heures, la solution se colore alors en brun rouge foncé. Par refroidissement, la solution abandonne une partie du produit de condensation qui précipite sous la forme de volumineuses aiguilles d'une teinte allant de l'orangé au jaune, c'est le sulfate du colorant de formule C<sub>19</sub>H<sub>2</sub>O<sub>5</sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Pour obtenir tout le colorant on ne filtre pas le produit formé, on alcalinise la solution jusqu'à coloration fuschine, on acidifie légèrement par quelques gouttes d'acide sulfurique, on chauffe quelque temps au bain-marie, après avoir dilué un peu d'eau ajoutée pour dissoudre le sel formé, on chauffe quelque temps encore au bain-marie, on obtient alors un fin précipité rouge orangé, le colorant est sous une forme facile à filtrer. On traite ce dernier par de l'eau chaude pour le débarrasser complètement de l'acide sulfurique. Le rendement est de 35 % de la théorie.

Si on veut obtenir le colorant sous la forme pure pour l'analyse, on se sert, soit du sulfate de fluorone, soit de la solution filtrée lors de la préparation; on la chauffe quelques heures encore et une partie du colorant se sépare en cristaux, on lave à l'eau, à l'alcool et à l'éther.

Pratiquement, nous avons préparé du sulfate de fluorone, que nous transformons en fluorone base, cette dernière purifiée donne un produit bien pur. La partie qui reste de la solution lors de la séparation du sulfate est récupérée et, à son tour, est transformée après purifications successives en fluorone base. Cette fluorone se présente sous la forme d'une poudre rouge violacé, insoluble dans le benzène, le chloroforme, assez soluble dans l'alcool, l'ester-acétique, l'acide

acétique cristallisable. Elle a un point de fusion nettement au-dessus de 300 degrés.

LIEBERMANN et LINDENBAUM signalent un leucodérivé, obtenu en réduisant la fluorone en solution alcoolique par du zinc en présence d'acide chlorhydrique. Nous avons obtenu la solution de ce leucodérivé, mais nous n'avons pas pu l'isoler à l'état cristallisé. Ce leucodérivé aurait été d'un usage intéressant en histochimie, car sa solution, peu colorée, aurait permis de percevoir facilement l'apparition de la coloration rouge donnée par le complexe antimonié. Il est dommage que nous n'ayons pas de renseignements plus complets pour l'obtention de ce corps qui serait d'après l'auteur le 9 phényl 2, 3, 6, 7 tétraoxyxanthène, d'ailleurs très instable.

Les auteurs ont signalé le sulfate de phényltrihydroxy-fluorone cristallisé dans l'ester-acétique de formule  $C_{19}H_{12}O_5H_2SO_4 + C_4H_8O_2$ ; ce dernier par chauffage à 108°, par perte d'ester acétique donne le sulfate de 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone qui peut conduire à une fluorone très pure. Nous avons essayé la technique donnée par l'auteur, mais nous n'avons pu obtenir que difficilement ce sulfate complexe. Le temps d'obtention a été très long et le rendement est faible.

### Préparation de la 9 Phényl, 2, 3, 7, 2' Tétraoxy, 6 Fluorone

On l'obtient par condensation de 2 molécules d'oxyhydroquinone avec une molécule d'aldéhyde salicylique. La technique de notre préparation a été la suivante : 40 g de triacétate d'oxyhydroquinone sont saponifiés à chaud, dans un mélange de 80 cm<sup>3</sup> d'eau et de 80 cm<sup>3</sup> d'alcool et de 12 cm<sup>3</sup> de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> concentré. Quand tout est dissous on ajoute 10 g d'aldéhyde salicylique. On chauffe au bain-marie bouillant pendant 6 à 12 heures, il se dépose du sulfate de fluorone, on retire le bécber du bain-marie et on ajoute une solution alcaline de soude concentrée jusqu'à neutralisation, le sul-

fate de fluorone précipite abondamment. On verse tout le contenu dans une grande quantité d'eau bouillante. Le colorant se sépare et on obtient très vite une masse visqueuse à reflet cantharidé, on l'agite très longuement de façon à obtenir un produit sans sulfate, on retire la masse enroulée au bout d'un agitateur, on dissout celle-ci à reflux dans de l'alcool où il est très soluble et on verse dans une quantité d'eau chaude maintenue aux environs de 60 degrés. On obtient le produit sous la forme d'une poudre brun rouge à reflet cantharidé et nous l'utilisons après l'avoir purifié une deuxième fois.

### **Préparation de la 9 Phényl, 2, 3, 7, 3', 4', Pentaoxy, 6 Fluorone**

Cette fluorone est obtenue par condensation de deux molécules d'oxyhydroquinone avec une molécule d'aldéhyde protocatéchique.

L'aldéhyde protocatéchique a été préparé par nous selon la technique de K. RIEMER et Ferd. TIEMAN (82) et (6) par action du chloroforme à chaud sur une solution de pyrocatechine en milieu alcalin. On purifie l'aldéhyde par combinaison bisulfite : lorsque l'aldéhyde a été bien purifié et séché, on prépare la fluorone selon cette technique :

On saponifie 20 g de triacétate d'oxyhydroquinone dans un mélange de 100 cm<sup>3</sup> d'eau, 100 cm<sup>3</sup> d'alcool et 20 g d'acide sulfurique concentré, lorsque tout est dissous on ajoute 5 g d'aldéhyde protocatéchique, on mélange avec soin et on chauffe au bain-marie pendant 6 à 8 heures. On obtient au bout de de temps un liquide brun foncé qui par refroidissement donne le sulfate du colorant que l'on sépare et transforme en fluorone base, après purifications successives, par dissolution dans l'alcool et précipitation dans l'eau bouillante.

Le produit se présente sous la forme d'une poudre brun rouge, soluble dans l'alcool donnant une forte fluorescence jaune verdâtre qui s'atténue en milieu sulfurique. En milieu

alcalin le colorant donne une coloration rouge avec une faible fluorescence rouge.

## II. — Dérivé secondaire de la condensation

En plus des fluorones préparées, nous avons isolé un autre produit : Mlle LIÉVIN dans sa thèse, s'est demandé s'il ne se formait pas au cours de la condensation finale d'autres produits que la fluorone (9 méthyl). Nous avons recherché dans le liquide de condensation la présence d'autres corps, et nous avons pu isoler un produit qui, d'après nos recherches, semble être le 2,3 dioxyxanthène signalé par LIEBERMANN et LINDENBAUM, comme pouvant prendre naissance au cours de ces condensations. Ces auteurs ont pu faire les dérivés acétylés de ce produit. Ce corps est très soluble dans l'eau bouillante, contrairement à la fluorone et recristallise par refroidissement. Ses solutions ne sont pas fluorescentes.

Ces techniques pratiques de préparations de quelques fluorones de l'oxyhydroquinone pourront peut-être, nous l'espérons, rendre quelques services à ceux qui voudront les préparer pour d'autres fins, que nous signalerons dans la suite de notre travail.

## DEUXIÈME PARTIE

### ÉTUDE DES RÉACTIONS DE QUELQUES FLUORONES ET EN PARTICULIER DE LA 9 PHÉNYL, 2, 3, 7 TRIHYDROXY, 6 FLUORONE

#### I. — Réactions sur des Substances minérales

Les fluorones dérivées de l'oxyhydroquinone, lors de leur synthèse en 1904, se sont révélées comme des colorants. La présence des hydroxyles en ortho communique aux fluorones la propriété de donner avec les mordants métalliques (fer et aluminium) des réactions de précipitation colorée. L'antimoine joue aussi le rôle de mordant en donnant des complexes peu solubles de couleur rouge en général. GUTZEIT, WEIBEL et R. DUCKERT (40) ont signalé la 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone comme le réactif spécifique de l'antimoine au  $pH$  4. Il serait intéressant de voir si une des fluorones préparées par nous ne présente pas une sélectivité plus marquée pour l'antimoine. Des premiers essais à différents  $pH$  ont montré que la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone, dans les mêmes conditions donne un précipité vivement coloré et foncé, plus dense et se déposant aussi plus vite. Tous ces avantages nous ont amené à entreprendre l'étude de la sensibilité et l'étude analytique de cette fluorone vis-à-vis des autres éléments, afin de voir si nous pouvions l'utiliser à la recherche qualitative et au dosage pondéral de l'antimoine.

A. — ÉTUDE QUALITATIVE DE LA RÉACTION FLUORONE-ANTIMOINE EN VUE DE LA SENSIBILITÉ DU RÉACTIF DE 9 PHÉNYL, 2, 3, 7 TRIHYDROXY, 6 FLUORONE.

On prépare une solution mère de sel d'antimoine contenant 20  $\gamma$  d'antimoine métalloïdique par centimètre cube, ajusté au  $pH$  4, de façon qu'aux environs de 25 degrés (température de l'expérience) 1 goutte de solution contienne 1  $\gamma$  d'antimoine métalloïdique.

A l'aide de cette solution nous faisons des dilutions afin d'obtenir des séries de solutions contenant dans chaque goutte respectivement 0  $\gamma$  05, 0,1  $\gamma$ , 0,2  $\gamma$  etc. 0,9  $\gamma$ . Le réactif est une solution alcoolique saturée de 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone à la température de l'expérience contenant sensiblement 0 g 250 % de produit à 25°.

En godet à l'aide d'un compte-goutte jaugé à 20 gouttes d'eau distillée au gramme, nous mettons une goutte de solution antimonée avec une goutte ou deux de fluorone et nous notons la «perceptibilité limite» avec un témoin eau distillée.

| 9 phényl trihydroxy fluorone | 9 méthyl trihydroxy fluorone<br>(Blancpain) | (Liévin)     |
|------------------------------|---------------------------------------------|--------------|
| P. L. = 0,15 $\gamma$        | 0,2 $\gamma$                                | 0,2 $\gamma$ |
| D. L. = 1 : 1.000.000        | 1 : 10.000.000                              | 1 : 250.000  |
| P. L. = Perception limite    | D. L. = Dilution limite                     |              |

Sur papier filtre on dépose une goutte de solution antimonée, puis 1 goutte de réactif, on note la coloration en comparant avec un témoin à l'eau distillée.

| 9 phényl trihydroxy fluorone | 9 méthyl trihydroxy fluorone<br>(Blancpain) | (Liévin)     |
|------------------------------|---------------------------------------------|--------------|
| P. L. = 2 $\gamma$           | 0,8 $\gamma$                                | 0,8 $\gamma$ |
| D. L. = 1 : 50.000           | 1 : 100.000                                 | 1 : 62.000   |

La phényl fluorone sur papier filtre donne de moins bons résultats qu'en godets avec l'antimoine, quelle que soit la valence, elle donne un complexe dont le  $pH$  de précipitation optimum est aux environs de 4. Avec l'émétique la précipitation va de  $pH$  1 à  $pH$  7 avec un maximum vers  $pH$  4.

B. — ÉTUDE QUALITATIVE DE LA RÉACTION FLUORONE-ANTI-MOINE EN VUE DE LA SPÉCIFICITÉ DU RÉACTIF.

Les conditions de nos recherches sont les suivantes. Le réactif est le même que précédemment. Les solutions d'anions et de cations sont préparées quand nous pouvons le faire, à la concentration d'un ion gramme pour mille. Les solutions d'anions sont celles des métaux alcalins. Les milieux de réaction, dont le  $pH$  varie de 1 à 7, sont préparés avec des solutions d'acide sulfurique, chlorhydrique, ou nitrique. Les bases employées pour repasser en milieu alcalin sont des solutions de soude, de potasse ou d'ammoniaque.

1<sup>o</sup> *Technique en tube à essai.* — Dans une série de tubes à essai, on verse 5 cm<sup>3</sup> de solution de  $pH$  1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7; on ajoute cinq gouttes de la solution d'ion à étudier (cette addition pratiquement ne change pas le  $pH$  du milieu); on ajoute ensuite le réactif goutte à goutte (5 gouttes ou 10 gouttes); après agitation on note les résultats; puis on revient en milieu alcalin en versant goutte à goutte la solution alcaline choisie. Dans certains cas la dissolution de certains ions exige une forte acidité; nous les dissolvons dans un bécher en tenant compte de la concentration; on ramène au  $pH$  voulu avec le  $pH$ -mètre de Hellige, ou au  $pH$ -mètre à électrode de verre de Jouan; on prélève 5 cm<sup>3</sup> de cette solution et on ajoute le réactif à raison de 5 à 10 gouttes. Quand le précipité formé est difficile à apprécier on attend un certain temps pour voir s'il se dépose, ou mieux on fait la réaction sur du papier filtre qui permet de constater s'il y a un précipité ou non.

2<sup>o</sup> *Technique sur papier filtre et sur godet.* — Dans certains cas particuliers où il faut distinguer les précipités avec plus de certitude, nous utilisons ces techniques qui sont plus sensibles. Nous opérons sur des gouttes données par un compte-gouttes jaugé. Nos résultats sont consignés dans les tableaux suivants.

Réactions de la 9 phényl, 2, 3, 7, trihydroxy 6 fluorone avec les cations

| Ions                  | Milieu neutre            | M. à pH = 4           | M. Acide pH < 4             | M. Alcalin pH > 4       |
|-----------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Ag .....              | 0                        | 0                     | 0                           | P (noir)                |
| Pb .....              | C (rouge)                | *C (rouge)            | C (rouge)                   | C (rose)                |
| Hg <sup>1</sup> ..... | C (rouge viol.)          | 0                     | pH <sup>5</sup> C (jaune)   | C (noirâtre)            |
| Tl (thallium) .....   | C (orange)               | 0                     | C (jaune)                   | C (rouge fusch.)        |
| As <sup>3</sup> ..... | C (rouge)                | *C (violacé léger)    | pH <sup>2</sup> C (violacé) | C (jaune rose)          |
| As <sup>5</sup> ..... | C (rouge)                | *C (rose violacé)     | C (jaune)                   | C (jaune orange)        |
| Sn .....              | P (peu net, brun orangé) | 0 lég. col.           | C (jaune)                   | C (rose pâle)           |
| Mo .....              | C (orange)               | 0                     | 0                           | C (rose)                |
| W .....               | 0 (jaune)                | 0                     | C (jaune)                   | C (rose violacé)        |
| Hg <sup>2</sup> ..... | Hyd. : P (rouge violacé) | *Hyd. : P (rouge)     | C (jaune)                   | C (violacé)             |
| Bi .....              | Hyd. : P (saumon)        | *Hyd. P (blanc rouge) | 0                           | Hyd : P (lilas)         |
| Cu .....              | p (rouge)                | *C (rose)             | p à pH <sup>3</sup>         | C (violet foncé)        |
| Cu <sup>2</sup> ..... | p (rouge)                | *C (rose)             | p à pH <sup>5</sup>         | C (bleu)                |
| Cd .....              | p (rouge)                | 0                     | C (jaune)                   | Hyd : (rose gélatineux) |
| Au .....              | 0                        | 0                     | 0                           | C (grisâtre viol.)      |
| Pt .....              | C (brun rouge)           | 0 (c. léger)          | C (jaune)                   | p (gris brun)           |
| Fe <sup>2</sup> ..... | C (violette)             | *C (violet noir)      | C                           | p (marron à viol.)      |
| Fe <sup>3</sup> ..... | C (violet noir)          | *C (violette)         | C                           | p (marron à noir)       |
| Cr .....              | C (orangé)               | 0                     | 0                           | C (rouge)               |
| Al .....              | C (orangé)               | 0                     | 0                           | p (rose gélatin.)       |
| Ce .....              | C (orangé)               | 0                     | C (jaune)                   | p (rouge)               |
| Zn .....              | C (rouge)                | *C (orange)           | C                           | p (rouge)               |
| Mn .....              | 0                        | 0                     | C                           | C (rose violacé)        |
| Ni .....              | (rose brun)              | 0                     | C (verte)                   | C (violette)            |
| Co .....              | p (rouge)                | *C (lég. orange)      | C (rose)                    | p (violet gélat.)       |
| Ca .....              | C (rose)                 | 0                     | C                           | C (rose)                |
| Ba .....              | C (orange)               | 0                     | C                           | C (rose)                |
| Sr .....              | C (orangé)               | C (léger)             | C                           | C (jaune brun)          |
| Li .....              | 0                        | 0                     | 0                           | 0                       |
| Mg .....              | C (rouge)                | 0                     | C                           | C (rose bonbon)         |
| K .....               | 0                        | 0                     | 0                           | 0                       |
| Na .....              | 0                        | 0                     | 0                           | 0                       |
| Nh <sup>4</sup> ..... | 0                        | 0                     | 0                           | 0                       |
| Divers :              |                          |                       |                             |                         |
| U <sup>02</sup> ..... | C (rouge)                | *C (rouge)            | C                           | p (corail foncé)        |
| Pd .....              | C (brun)                 | 0                     | 0                           | p (violacé)             |
| Th .....              | C (rouge léger)          | C (rose)              | C (rose)                    | C (rose)                |
| Se .....              | C (rouge)                | 0                     | C (rose)                    | C (rose)                |

0 = pas de précipité    C = coloration    p = léger précipité    P = précipité  
 hyd = hydrolyse.

*Réactions de la 9 phényl, 2, 3, 7, trihydroxy, 6 fluorone avec les anions*

| Ions                                                | Milieu neutre                 | M. pH = 4       | M. Acide      | M. Alcalin        |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------|---------------|-------------------|
| F <sup>-</sup> .....                                | rose                          | C (rose)        | 0             | 0                 |
| Cl .....                                            | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| ClO .....                                           | décoloration<br>p. blanchâtre | p. blanchâtre   | p. blanchâtre | 0                 |
| ClO <sup>3</sup> .....                              | C                             | 0               | 0             | 0                 |
| ClO <sup>4</sup> .....                              | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| Br .....                                            | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| I .....                                             | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| S <sup>2</sup> O <sup>4</sup> et S....              | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| SO <sup>3</sup> .....                               | brun                          | 0               | 0             | 0                 |
| SO <sup>4</sup> .....                               | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| S <sup>2</sup> O <sup>3</sup> .....                 | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| NO <sup>3</sup> .....                               | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| NO <sup>2</sup> .....                               | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| PO <sup>2</sup> .....                               | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| PO <sup>3</sup> .....                               | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| PO <sup>4</sup> .....                               | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| CO <sup>3</sup> .....                               | C (fluorone)                  | 0               | 0             | 0                 |
| CN .....                                            | C (violacé)                   | 0               | 0             | 0 (violacé)       |
| (Fe CN <sup>6</sup> ) <sup>4</sup> ..               | C jaune verdâtre              | C (j. verdâtre) | 0             | 0                 |
| (Fe CN <sup>6</sup> ) <sup>3</sup> ...              | C (verdâtre)                  | C (verte)       | 0 (vert)      | 0 (jaune)         |
| SCN .....                                           | 0 (jaune)                     | 0               | 0             | 0 (rose)          |
| SiO <sup>3</sup> .....                              | p. (rose géla-<br>tineux)     | (gélatineux)    | 0             | 0                 |
| BO <sup>2</sup> .....                               | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| (C <sup>2</sup> O <sup>4</sup> ) <sup>3</sup> ..... | orangé                        | C (orangé)      | 0             | 0 (jaune)         |
| (Cr <sup>2</sup> O <sup>4</sup> ) <sup>4</sup> ...  | orangé                        | orangé          | 0             | 0 (jaune)         |
| Mn O <sup>4</sup> .....                             | décoloration                  | décoloration    | violette      | C (brun verdâtre) |
| CH <sup>3</sup> COOH .                              | 0                             | 0               | 0             | 0                 |
| H COOH ...                                          | 0                             | 0               | 0             | 0                 |

*Discussion des résultats de la 9 phényl 2, 3, 7 trihydroxy,  
6 fluorone avec les cathions*

Les colorations données avec un astérisque sont dues à des précipités d'adsorption différents des colorations données par la fluorone ou par les ions colorés.

*Pb.* — Le plomb donne un précipité d'adsorption assez net de couleur rouge en milieu neutre et acide, et rose en milieu alcalin. La coloration donnée par ce dernier à  $pH$  4 n'offre pas d'intérêt particulier, car elle n'a rien de comparable avec celle des précipités antimoniés qui sont beaucoup plus vifs et plus nets.

*Hg.* — Le mercure I donne des précipités d'adsorption rouge violacé et jaunâtre, peu gênant car la précipitation se fait en milieu neutre. A  $pH$  5 la réaction est déjà négative. Le mercure II donne un précipité rouge violacé en milieu neutre et légèrement rouge au voisinage du  $pH$  4. Cette coloration est très différente de celle de l'antimoine. Il semble que si l'on descend à  $pH$  4 le mercure s'hydrolyse en partie et la réaction devient peu sensible.

*Sn.* — Les précipités d'étain ne sont pas nets surtout au voisinage de  $pH$  4 on obtient à peine une légère coloration.

*As.* — L'arsenic III et l'arsenic V donnent des précipités violacé léger et rose violacé très différents de ceux de l'antimoine. Le  $pH$  de floculation maximum de l'arsenic est au voisinage de 2 et 2,5. Les précipités formés sont solubles dans un acide de concentration plus faible que ceux de l'antimoine.

*Sb.* — L'antimoine III et l'antimoine V donnent avec cette fluorone des précipités rouge orangé vif, très nets, d'un grand intérêt analytique. Ils sont solubles dans un acide de concentration 8,25 cm<sup>3</sup> % (c'est-à-dire ClH normal).

*Bi.* — Le bismuth donne une coloration « blanc et rouge » due sans doute à l'hydrolyse partielle du métal, cette hydro-

lyse commence aux environs de  $pH$  4 pour s'accroître aux  $pH$  alcalins.

*Cu.* — Le cuivre I et II donne des précipités d'adsorption de couleur rouge carmin à rose. Le  $pH$  de floculation maximum est 3 et 5 respectivement.

*Fe.* — Les précipités donnés par le fer II et le fer III sont respectivement violet et violet noir. Ce sont vraisemblablement des laques ferriques analogues à celles de l'hématoxyline et elles mettent en évidence les groupements phénoliques de la fluorone.

*Pt, Zn, Co, Sr.* — Donnent des colorations n'ayant rien de particulier au point de vue analytique, elles seraient dues en partie au colorant insolubilisé lors de la réaction.

*Uo.* — Donne une coloration légèrement rouge dont le maximum de floculation serait plutôt en milieu alcalin.

*Th.* — Donne également une légère coloration rose due à un précipité d'adsorption peu important.

#### *Discussion des résultats avec les anions.*

Les anions ne donnent aucun résultat vraiment caractéristique.

Les fluorures donnent une coloration rose avec la fluorone, due sans doute à leur alcalinité.

L'acide hypochloreux donne un précipité blanc jaunâtre, sans importance.

Les sulfites donnent un léger précipité en milieu neutre et alcalin, ce serait du colorant insolubilisé.

Le ferricyanure donne avec la fluorone une coloration verte qui s'accroît avec le temps. On obtient alors un colorant différent, dont la phase colorée, contrairement à celle de la fluorone, se trouve être en milieu acide (coloration verte) et la phase peu colorée en milieu alcalin (coloration jaunâtre).

Les chromates et bichromates donnent une légère coloration due sans doute à l'oxydation partielle de cette fluorone.

Le permanganate décolore les fluorones, il y aurait également oxydation de cette dernière.

### *Conclusion.*

Certains ions peuvent être écartés du fait de leur coloration différente de celle de l'antimoine. Dans le cas des anions, on ne trouve pas de réaction colorée gênante, à part le ferricyanure qui donne une coloration verte qui ne peut être confondue avec celle de l'antimoine. Dans le cas des cations, un certain nombre d'entre eux, comme le fer (qui donne une coloration violette), le platine, l'étain, le zinc, le cobalt, le strontium, le thorium, ne gênent pas d'une façon appréciable. Seuls les ions gênants comme le plomb, le mercure, l'arsenic, le bismuth, le cuivre, l'uranium, dont les colorations sont plus ou moins rouges, peuvent diminuer la sensibilité du réactif. En fixant la valeur du  $pH$  de la réaction et en faisant intervenir la solubilité des complexes de ces corps dans les acides de concentration différente, on peut arriver à une haute sélectivité. Si nous choisissons un  $pH$  compris entre 3 et 4, à 3,5 par exemple, on voit que l'on n'est plus gêné par l'arsenic et le cuivre, de même pour le mercure et le bismuth. Il ne reste plus que le plomb et l'uranium qui, à ce  $pH$ , ne sont pas très sensibles au réactif et peuvent être très facilement distingués de l'antimoine.

Si pour les méthodes générales, nous sommes obligés de fixer la valeur du  $pH$  à 3,5 pour rendre spécifique la détection de l'antimoine, cette valeur peut être avec avantage déplacée vers la valeur 4 quand on cherche l'antimoine seul. En présence d'autres ions présumés connus, on a avantage à déplacer la valeur du  $pH$  de façon à rendre le réactif plus sélectif. On peut donc dire que la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone est un réactif très sélectif de l'antimoine et qu'on peut l'utiliser aussi bien que la 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone.

C. — ÉTUDE QUANTITATIVE DE LA RÉACTION FLUORONE-ANTIMOINE ET DOSAGE PONDÉRAL DE L'ANTIMOINE PAR LA 9 PHÉNYL 2, 3, 7 TRIHYDROXY 6 FLUORONE.

Le dosage de l'antimoine par une méthode pondérale à l'aide d'un réactif spécifique la 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone a été esquissé par Cl. Paul BLANCPAIN (8). L'auteur n'ayant pu peser directement le complexe formé est obligé de transformer l'antimoine en tétroxyde et de le doser sous cette forme. On perd ainsi l'avantage de la sensibilité de la réaction fluorone-antimoine ainsi que la précision du dosage gravimétrique. Le produit formé avec la 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone contient 30,8 pour cent d'antimoine uni dans un complexe de poids moléculaire égal à 394,83.

En préparant les fluorones nous avons cherché le réactif adéquat pour un dosage direct et nous avons choisi la 9 phényl 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone qui donne un complexe de poids moléculaire plus grand (456,76) et qui renferme 28,6 % d'antimoine. Cette fluorone facilement préparée à l'état pur grâce à ses sulfates, donne avec l'antimoine un complexe rouge se déposant assez vite après chauffage. Ce complexe est peu soluble.

A 25° la solubilité dans l'eau est égale à 0 g 0001 pour cent.

A 25° la solubilité dans l'alcool est égale à 0 g 0003 pour cent.

A 25° la solubilité dans l'éther est égale à 0 g 0025 pour cent.

Le réactif lui-même est assez soluble dans l'alcool à 95°.

A 25° la solubilité dans l'alcool à 95° est de l'ordre de 0 g 250 pour cent.

A chaud la solubilité dans l'alcool à 95° est environ de 0 g 8 pour cent en présence d'acide sulfurique.

Malgré la faible valeur absolue de la solubilité de la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone, nous avons pu grâce à notre technique obtenir des résultats très satisfaisants.

*Principe de la méthode.*

L'antimoine trivalent (émétique) amené à pH 4 par addition de  $\text{ClH}$ , est précipité par une solution extemporanée al-

coolique de 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone exactement pesée. Après lavage par décantation à l'alcool et à l'eau, le complexe, recueilli sur des filtres conjugués et tarés, est pesé après séchage; comme vérification, on peut transformer l'antimoine en tétr oxyde et peser le résidu de la calcination.

### *Technique de la méthode.*

Nous utilisons une solution d'émétique contenant, par exemple, à 25°, 5 mg d'antimoine métalloïde par 10 cm<sup>3</sup>. L'acide chlorhydrique qui sert pour obtenir un pH 4 est une solution n/10. Le réactif est la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone pure et séchée à 70 ou 80° puis dans le vide sulfurique. On pèse, au moment du dosage, juste la quantité à peine supérieure à la quantité théorique. La facilité du dosage est facteur de la petitesse de l'excès de fluorone. Cette fluorone est dissoute à chaud dans l'alcool à 95°. L'eau distillée utilisée pour le lavage, ainsi que l'alcool, sont filtrés sur un filtre lavé préalablement. Les filtres utilisés sont des filtres Durieux sans cendres (0,000098) à filtration lente (bande bleue) et de 90 mm de diamètre. On les adapte à un entonnoir à filtration rapide de 15 cm<sup>3</sup> monté sur un Erlenmeyer relié à une trompe à vide.

Après les premiers dosages sur des prises d'essai différentes, nous avons obtenu des résultats approximatifs.

|                                  |                                  |                                  |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Prise d'essai :                  | 2 cm <sup>3</sup> = 1 mg de Sb   | 5 cm <sup>3</sup> = 2,5 mg de Sb |
| Complexe théorique :             | 3,73 mg de Sb                    | 9,33 mg de Sb                    |
| Chiffres effectivement trouvés : | 3,7<br>3,8                       | 9,3<br>8,4<br>10,3               |
| Prise d'essai :                  | 10 cm <sup>3</sup> = 5 mg de Sb  | 20 cm <sup>3</sup> = 10 mg de Sb |
| Complexe théorique :             | 18,67 mg de Sb                   | 37,35 mg de Sb                   |
| Chiffres effectivement trouvés : | 18,8<br>20,5                     | 37,1<br>38,0<br>38,3             |
| Prise d'essai :                  | 50 cm <sup>3</sup> = 25 mg de Sb |                                  |
| Complexe théorique :             | 93,3 mg de Sb                    |                                  |
| Chiffre effectivement trouvé :   | 93                               |                                  |

Les chiffres trouvés semblent justifier l'équation théorique. Aussi avons-nous cherché à mettre au point une

technique. Les petites prises d'essai donnent de bons résultats; mais les erreurs relatives sont assez grandes. Nous avons choisi 10 cm<sup>3</sup> et 20 cm<sup>3</sup> en soignant particulièrement le lavage. Nous opérons sur une série de 3 prises d'essai identiques.

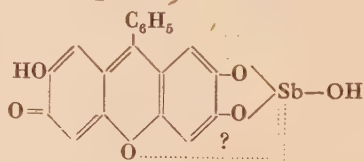
Dans 3 béchers de 50 cm<sup>3</sup> on met successivement 10 cm<sup>3</sup> d'émétique correspondant à 5 mg d'antimoine. Dans chacun on verse 2 gouttes d'acide chlorhydrique n/10 qui donnent un pH voisin de 4; on chauffe légèrement. Pendant ce temps on pèse la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone dans un verre de montre, la quantité doit être inférieure à 60 mg. On lave le verre de montre et on entraîne la fluorone avec 5 cm<sup>3</sup> d'alcool dans un récipient de 100 cm<sup>3</sup>. On ajoute 30 cm<sup>3</sup> d'alcool, on chauffe avec précaution pour dissoudre le réactif, on retire du Bunsen en baissant préalablement la flamme; on met 10 cm<sup>3</sup> de solution dans les trois béchers. Dans la solution restante on ajoute 20 cm<sup>3</sup> d'alcool, on dissout à chaud le peu de fluorone non solubilisée; on répartit également dans les 3 béchers; on lave le récipient avec 5 cm<sup>3</sup> d'alcool et on répartit de la même manière. Dans chaque bécher on a définitivement 20 cm<sup>3</sup> de fluorone. On porte alors les 3 béchers à une douce ébullition pendant 10 minutes; on refroidit et on laisse décanter 15 minutes. Pendant ce temps on tare les filtres préalablement séchés et conservés dans un exsiccateur bien clos. On adapte les deux filtres tarés emboîtés l'un dans l'autre selon la technique des filtres conjugués. On colle les rebords (en les mouillant d'alcool), contre l'entonnoir. On fait un onglet à la partie supérieure du filtre interne pour empêcher le précipité de monter. On décante la liqueur surnageante qui doit être légèrement teintée en jaune pâle. On lave le précipité avec 10 cm<sup>3</sup> d'alcool, on décante. Après 2 lavages identiques, la fluorone pratiquement a disparu; on entraîne le précipité sur le filtre, on lave ensuite par 10 cm<sup>3</sup> d'eau distillée tiédie aux environs de 30°, on lave 2 ou 3 fois pour entraîner le reste d'acide C<sub>12</sub>H et d'acide tartrique qui aurait pu rester. L'addition

d'eau sur le précipité imbibé d'alcool fort, donne lieu à un phénomène de tension superficielle, et il y a un brassage énergique des particules du complexe, empêchant ainsi le colmatage des pores du filtre, ce qui facilite le lavage final. Après séchage à l'étuve entre 70 et 80° on pèse rapidement au sortir de l'exsiccateur.

Pour une prise d'essai de 20 cm<sup>3</sup>, on double les doses, mais dans les lavages on utilise seulement 40 cm<sup>3</sup> d'alcool versés en 4 fois et environ 40 cm<sup>3</sup> d'eau. On doit régler la trompe de façon que le vide ne soit pas trop fort au début du lavage.

### Résultats.

Le dosage est basé sur la réaction de la fluorone sur l'antimoine donnant un complexe de formule suivante :



1 mg d'antimoine métalloïdique correspond à 3,735 mg du complexe.

Les résultats donnés par notre technique mise au point sont exposés ci-dessous :

Prise de 10 cm<sup>3</sup> :

|                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| Poids théorique du complexe ..... | 18,67 mg |
| Trouvés .....                     | 18,7     |
|                                   | 18,3     |
|                                   | 18,2     |
|                                   | 18,6     |
|                                   | 18,5     |
|                                   | 18,2     |
|                                   | 18,7     |
| Erreur relative maximum .....     | 2,5 %    |
| Erreur relative moyenne .....     | 1 %      |
| Erreur absolue moyenne .....      | ± 0,2 mg |

Prise de 20 cm<sup>3</sup> :

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| Poids théorique du complexe ..... | 37,35 |
| Trouvés .....                     | 37,4  |
|                                   | 37,3  |
|                                   | 37,3  |

Erreur relative maximum ..... 1,3 %

Erreur relative moyenne ..... 0,5 %

Erreur absolue moyenne  $\pm$  0,02 pratiquement = 0,2 mg

Ces résultats, comme on l'a vu, ont été obtenus par une technique assez simple, que nous croyons devoir préconiser pour doser de petites quantités d'antimoine.

## II. — Réactions sur les substances organiques

### A. — NOUVELLES COLORATIONS NUCLÉAIRES ET POSSIBILITÉS D'UNE RÉACTION NUCLÉALE PAR LES FLUORONES.

Avec le temps un réactif alcoolique de 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone, de  $pH = 4$  et de formule suivante :

|                                 |                     |
|---------------------------------|---------------------|
| 9 méthyltrihydroxy fluorone ... | 0 g 08              |
| ClH pur .....                   | V gouttes           |
| acide tartrique .....           | 2 g                 |
| alcool à 95° .....              | 100 cm <sup>3</sup> |

devient de plus en plus acide, malgré l'utilisation d'une substance tampon (acide tartrique). Le  $pH$ , au bout d'une vingtaine de jours, diminue successivement de 4 à 3,5, 2,8, 2,5, 1,8, 1,5, 1. C'est au voisinage de cette dernière valeur que des coupes histologiques de pièces diversement fixées, et étudiées avec TURCHINI et CASTEL (94), incluses à la paraffine ou coupées à la congélation, donnent une coloration nucléaire d'une grande finesse. Par traitement pendant 15 à 20 minutes avec le réactif préalablement mûri, et virage au carbonate de sodium à 1 pour cent, les noyaux sont colorés en violet, comme dans la coloration à l'hématéine, tandis que le cytoplasme est à peine teinté en mauve clair. On peut associer

cette coloration avec divers colorants cytoplasmiques (éosine-éosine-orange, vert lumière, jaune de méthanil etc.).

Cette technique, comme nous l'avons déjà signalé (94) donne de meilleurs résultats avec les noyaux des cellules animales, mais présente l'inconvénient de nécessiter l'emploi d'un réactif long à préparer.

Aussi fallait-il chercher à améliorer les résultats. L'acide chlorhydrique du réactif, hydrolyse les nucléoprotéides du noyau, mais n'est pas assez fort pour hydrolyser régulièrement toutes les coupes et donne parfois des colorations irrégulières. En scindant la technique précédente en deux, en faisant d'abord une hydrolyse par l'acide chlorhydrique normal, puis en faisant réagir le réactif de 9 méthyl-trihydroxy-fluorone préparé extemporanément sans acide tartrique, on peut arriver à colorer aussi bien les noyaux des cellules animales, que les noyaux des Végétaux supérieurs et même des Levures. Si on hydrolyse trop longtemps les coupes, ou si l'on emploie un acide chlorhydrique trop fort, la cellule paraît être vidée de ses éléments et la coloration ne se fait plus. La coloration nucléale chez les Végétaux est plus délicate, car l'acide thymonucléique chez les Végétaux est plus stable lors de l'hydrolyse, cette stabilité peut être accrue sous l'action de certains fixateurs. L'étude de cette réaction permet de la rapprocher de la réaction nucléale de Feulgen, basée sur l'hydrolyse de l'acide thymonucléique, mais où une des fluorones remplace l'acide fuchsine sulfureux. Comme cette dernière, elle permet de distinguer l'acide thymonucléique du noyau de l'acide zymonucléique contenu dans le cytoplasme. Aussi donnerons-nous quelques détails de technique (95) (97).

*Réaction nucléale par la 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone.*

Les coupes déparaffinées, au sortir des alcools sont hydrolysées à 60° par une solution d'acide chlorhydrique normal. Les lames sont plongées dans un tube de Borrel pendant

5 minutes à la température de 60°. Les coupes rincées à l'eau distillée, sont colorées sur lames pendant 5 à 10 minutes par le réactif de 9 méthyl-trihydroxy-fluorone préparé extemporanément selon la formule suivante :

|                                  |                     |
|----------------------------------|---------------------|
| Méthyl trihydroxy fluorone ..... | 0 g 08              |
| Cl H pur .....                   | XV gouttes          |
| alcool q. s. ....                | 100 cm <sup>3</sup> |

On élimine le colorant par quelques gouttes d'alcool à 90°, après lavage à l'eau ordinaire, la coupe prend une coloration brun rouge. On vire ensuite dans une solution de carbonate de soude à 1 pour cent. On rince à l'eau et, après déshydratation, on monte au baume.

Examinée au microscope la coloration nucléaire est identique à celle de l'hématéine. La présence d'acide thymonucléique est indiquée par une coloration violette et celle de l'acide zymonucléique par une légère coloration rose ou mauve. Les détails du noyau sont d'une grande finesse, on voit bien le nucléole, la chromatine. Les éléments en division sont nettement colorés, les noyaux en pycnose sont colorés en violet, mais avec une teinte légèrement différente.

Les autres fluorones ont donné des résultats analogues.

*Réaction nucléale par la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone.*

Le réactif est sensiblement le même, mais plus concentré en fluorone et préparé selon cette formule :

|                                                           |                     |
|-----------------------------------------------------------|---------------------|
| 9 phényl trihydroxy fluorone q. s. pour saturer l'alcool. |                     |
| alcool à 95° .....                                        | 100 cm <sup>3</sup> |
| SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> pur .....                  | IV à V gouttes      |

La solution obtenue après homogénéisation est brun rouge et légèrement fluorescente. La réaction se fait par la même technique, mais l'hydrolyse est conduite d'une manière un peu différente. L'hydrolyse à chaud par l'acide chlorhy-

drique normal abîme et décolle les coupes. Les tissus fragiles ne supportent souvent pas cette action, aussi convient-il d'opérer l'hydrolyse à froid de la manière suivante :

Les coupes déparaffinées au sortir de l'alcool à 90° sont plongées pendant 5 minutes environ dans un tube de Borrel contenant une solution à 8,25 cm<sup>3</sup> de ClH dans 100 cm<sup>3</sup> d'alcool à 80°. On lave à l'eau distillée, puis à l'alcool et on colore sur lame pendant 5 à 10 minutes. Les coupes traitées ensuite comme précédemment, sont montées au baume. Les noyaux colorés en bleu violacé tranchent sur un cytoplasme rose. La coloration donne un contraste plus marqué entre noyau et cytoplasme. La finesse des détails est bien plus grande qu'après l'hématéine. Dans certains cas la coloration vaut, largement même, une hématoxyline au fer. Elle est d'une finesse égale, avec une durée de coloration plus rapide (10 à 15 minutes). La coloration des coupes se conserve parfaitement.

*Réaction nucléale par la 9 phényl, 2, 3, 7, 2' tétraoxy, 6 fluorone.*

La formule du réactif et la technique de la réaction sont les mêmes que pour la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone. Les noyaux sont colorés en rouge brun à reflet violacé sur un fond de cytoplasme orangé. On peut associer cette coloration nucléaire avec les colorations cytoplasmiques, en insistant préalablement sur le lavage alcoolique pour se débarrasser complètement du colorant. Après virage au carbonate, on fait alors cette seconde coloration et on monte au baume.

*Réaction nucléale par la 9 phényl, 2, 3, 7, 3', 4' pentaoxy, 6 fluorone.*

Le réactif et la réaction se font comme précédemment. Les noyaux sont colorés en rouge violacé ou brun violacé, le cytoplasme est jaune clair ou jaune orangé.

On voit donc que cette réaction nucléale sur coupe histologique n'est possible qu'avec une hydrolyse acide préalable, elle peut se faire avec diverses fluorones, mais les résultats les plus intéressants sont avec la 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone et la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone. Cette dernière donne un contraste plus marqué entre le noyau et le cytoplasme et permet de mieux distinguer l'acide thymonucléique.

#### B. — COLORATION NUCLEAIRE PAR LES LAQUES FERRIQUES DE FLUORONE.

A côté des réactions nucléales nous avons trouvé une coloration nucléaire par les laques ferriques des fluorones (97<sup>1</sup>). Dans sa thèse, BLANCPAIN pensait que la fluorone (9 méthyl) devait donner des laques avec les sels de fer. Sa remarque nous a conduit à une application pratique. Les fluorones de l'oxyhydroquinone possèdent en effet des groupements phénoliques qui donnent avec les sels ferriques une coloration noir violacé par formation de laque. Les fluorones sans hydrolyse ne peuvent donner de coloration. A cet effet elles doivent être associées à une base avec laquelle elles donnent des laques. La base qui sert de mordant peut être l'alumine ou bien être empruntée à un sel de fer, de cuivre, de chrome, de tungstène, de vanadium etc. Avec les sels de fer le mordant et le colorant sont appliqués séparément et la laque se forme dans le tissu à colorer. De toutes les fluorones la 9 phényl 2, 3, 7, 3', 4' pentaoxy, 6 fluorone possède le plus de fonctions phénol, elle donne avec les sels de fer une coloration noir violacé qui se trouve être la plus forte de toutes les fluorones, lors des réactions à la touche sur papier filtre. Nous avons essayé de faire une coloration nucléaire avec cette dernière en formant des laques ferriques par la méthode de Heindenhain. Les résultats sont aussi bons que ceux de l'hématoxyline au fer. Aussi en rappellerons-nous le mode opératoire (51).

*Coloration par formation de laque ferrique avec la 9 phényl,  
2, 3, 7, 3', 4' pentaoxy, 6 fluorone.*

Les coupes, déparaffinées au sortir de l'alcool et de l'eau, sont plongées dans une solution d'alun de fer à 3 pour cent pendant 30 minutes à 12 heures selon l'effet désiré. On lave rapidement à l'eau distillée. Sur lame on colore quelques minutes avec une solution alcoolique saturée de fluorone. On élimine l'excès du colorant par quelques gouttes d'alcool à 95°. La coupe rincée à l'eau ordinaire est virée avec soin dans une solution de carbonate de soude à 1 pour cent. Les coupes montées au baume présentent des noyaux noir violacé. Le cytoplasme est légèrement teinté. Dans cette technique nous avons mordancé 30 minutes à l'alun de fer et coloré pendant 10 minutes avec le réactif. Si la différenciation à l'alun de fer n'est pas satisfaisante, on peut différencier avec précaution par de l'alcool légèrement acidifié.

Cette technique de coloration peut être proposée comme succédanée de celle à l'hématoxyline au fer. La coloration est très fine et le réactif préparé extemporanément peut rendre des services à l'histologie par la rapidité de son action.

C. — ÉTUDE DE L'ACTION DES FLUORONES SUR LES ACIDES  
NUCLÉIQUES CELLULAIRES ET SUR QUELQUES SUCRES.

La réaction nucléale avec les fluorones paraît importante, aussi TURCHINI, CASTEL et nous même (96) avons essayé d'en approfondir le mécanisme en reprenant nos expériences et en recherchant l'action chimique des fluorones sur les acides nucléiques cellulaires et sur quelques sucres, ce qui nous a conduit à un certain nombre d'expérience dont les résultats sont ci-dessous rapportés.

I. — Résultats obtenus sur des coupes histologiques.

a) *Réaction sur le cytoplasme.* — La fixation au sublimé peut donner avec les fluorones une coloration, aussi prati-

quons-nous la réaction sur des pièces fixées au formol, lavées très longuement (59); on coupe à la congélation, sans hydrolyser on plonge 10 à 15 minutes les coupes dans le réactif; on les lave à l'alcool, à l'eau; puis on les fait passer dans une solution de carbonate de sodium à 1 pour cent. Le cytoplasme est seul coloré, conformément au tableau ci-joint :

|            | 9 méthyltrihydroxy-fluorone                | 9 phényltrihydroxy-fluorone                |
|------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Cytoplasme | légèrement teinté en mauve très pâle       | teinté légèrement en rose                  |
| Noyau      | non coloré après séjour de 10 à 15 minutes | non coloré après séjour de 10 à 15 minutes |

b) *Réaction sur le noyau.* — Nous avons essayé des réactifs à la fluorone sans alcool. Pour solubiliser le colorant, on doit ajouter de l'acide sulfurique. Nous avons préparé deux réactifs aqueux à 3 pour cent et à 8 pour cent de  $\text{SO}_4\text{H}_2$ .

|                                                  |                                                     |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Réactif à 3 pour cent de $\text{SO}_4\text{H}_2$ | après 10 minutes les noyaux sont colorés faiblement |
|                                                  | après 12 heures les noyaux sont fortement colorés   |
| Réactif à 8 pour cent de $\text{SO}_4\text{H}_2$ | après 10 minutes les noyaux sont colorés            |
|                                                  | après 1 heure les noyaux sont fortement colorés     |

D'après le tableau on voit que l'alcool n'intervient pas dans l'hydrolyse d'une façon sensible. Seuls les acides  $\text{SO}_4\text{H}_2$  ou  $\text{ClH}$  hydrolysent les coupes dans le délai de 10 à 15 minutes, alors que le réactif que nous avons préconisé n'hydrolyse pas en pratique dans ce laps de temps.

Les coupes à la paraffine ou à la congélation, après les fixations les plus diverses, sont hydrolysées à chaud à  $60^\circ$

par ClH normal selon la technique de Feulgen (51), ou bien elles le sont à froid (45, 46) dans une solution alcoolique à 8,25 cm<sup>3</sup> pour cent de ClH pendant 4 à 5 minutes. On lave et colore par quelques gouttes de réactif versées sur la lame. Après lavage rapide à l'alcool, puis à l'eau, on termine par le virage au carbonate de soude à 1 pour cent. Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau suivant :

| Réactifs   | méthyltri-<br>droxyfluorone | phényltri-<br>droxyfluorone | phényltétra-<br>oxyfluorone    | phénylpenta-<br>oxyfluorone   |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Noyau      | violet foncé                | bleu violacé                | rouge brun à<br>reflet violacé | rouge violacé<br>à rouge brun |
| Cytoplasme | mauve clair                 | rose clair                  | orangé clair                   | jaune clair                   |

Les noyaux des cellules végétales (Ail, Lupin) sont colorables par ces techniques, mais après une hydrolyse plus longue. La durée est variable avec le fixateur employé et avec l'espèce végétale envisagée (5) et (66). Nous donnerons ici une des techniques préconisées (97).

Les extrémités de racine d'Ail ou de Lupin sont fixées au liquide de Bouin pendant 2 heures. Les coupes déparaffinées sont placées dans l'alcool à 96° pendant 12 à 24 heures. Au sortir des alcools on hydrolyse par ClH normal à la température de 60°, ou mieux dans une solution de 8,25 cm<sup>3</sup> pour cent de ClH, d = 1,19, dans de l'alcool à 80°, à la température ordinaire (20°). Après fixation au liquide de Bouin, la durée de l'hydrolyse est de 9 à 10 minutes pour l'Ail et de 5 à 6 minutes pour le Lupin. Après fixation au liquide de Flemming cette durée est de 20 à 25 minutes pour l'Ail et de 7 à 10 minutes pour le Lupin. Les coupes lavées et mises en milieu alcoolique, sont colorées sur lames pendant 10 à 15 minutes avec quelques gouttes de réactif. On enlève l'excès du colorant avec quelques gouttes d'alcool à 90°; on lave à l'eau et on vire dans une solution de carbonate de soude. Après virage on monte au baume. Quand on emploie la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone le cytoplasme est coloré en jaune clair ou jaune orangé. Le noyau est bleu

violacé. Au repos on voit très nettement coloré de la sorte le réseau de chromatine de l'Ail et les prochromosomes de Lupin. Au cours de la division les chromosomes sont fortement colorés. La caryolymph est incolore, le nucléole plasmatique est rose orangé. Dans les pycnoses par les narcotiques, la chromatine compacte est colorée en rouge violacé. Le noyau laisse voir nettement des nucléoles rose orangé. Dans la caryorhexie la chromatine diffuse dans le cytoplasme et les nucléoles sont très visibles. Avec des tissus normaux, quand la réaction est bien conduite on obtient des préparations aussi belles que celles des cellules animales. La difficulté rencontrée au début ne venait pas, comme nous l'avions pensé, d'une teneur plus faible en acide thymonucléique chez les Végétaux, mais d'une stabilité plus grande de cet acide.

Nous avons étendu avec succès nos réactions à l'étude des Levures et localisé les acides thymo et zymonucléiques dans le noyau et au voisinage des corpuscules métachromatiques. Notre réaction permet d'étudier la morphologie et l'évolution du noyau. Les résultats obtenus nous paraissent nettement supérieurs à ceux de l'hématoxyline au fer et au Feulgen. Aussi en redonnerons-nous la technique. La levure de *Saccharomyces ellipsoïdeus*, REESS et PASTEUR, est prélevée sur moût concentré de raisin. On la délaye sur lame dans une goutte d'eau. On fait bouillir sur une platine jusqu'à obtention d'un frottis sec. On fait agir sur ce frottis le liquide de Bouin pendant une heure. On porte la lame dans l'alcool à 96° pendant douze heures. On lave à l'eau pour enlever les sucres. On hydrolyse par la solution d'alcool acide pendant 5 minutes. Rinçage à l'eau et à l'alcool. On colore sur lame pendant 10 à 15 minutes avec quelques gouttes du réactif. Après lavage et virage on monte au baume. Les préparations sont assez belles. Le cytoplasme est coloré le plus souvent en jaune rosé, parfois en rouge ce qui est alors dû à un reste de sucre de raisin. Le noyau est coloré en bleu violacé. Les corpuscules métachromatiques de BABÈS et GUILLIERMOND

formés d'acide zymonucléique, sont colorés en jaune rosé plus accentué. La réaction nucléale sur les Levures donne de très belles colorations. Elle confirme la présence d'acide thymonucléique au niveau de la chromatine du noyau et met en évidence l'acide zymonucléique au voisinage des corpuscules métachromatiques ainsi que des réserves glucidiques intra-vacuolaires. Dans notre réaction les noyaux apparaissent plus nettement que dans les colorations à l'hématoxyline ou après celle de Feulgen. Nous avons pensé qu'elle donnerait d'utiles indications pour l'étude des Végétaux inférieurs.

Enfin les Bactéries malgré leur petitesse, sont intéressantes à examiner. Dans le bacille de Koch, la réaction révèle l'existence de granulations décelables, il est vrai, après les colorations usuelles. La technique devra être quelque peu modifiée à cause sans doute de l'enveloppe cireuse externe du Bacille (97<sub>2</sub>). Dans ces conditions les granulations sont colorées en bleu violacé ce qui traduit la présence de ribodésose, que nous pensons provenir d'une hydrolyse d'acide thymonucléique existant au niveau des grains, bien que la tuberculine puisse la fournir également (97) car dans ce dernier cas elle se montrerait diffuse. Dans l'ensemble nous pouvons affirmer que la nouvelle réaction nucléale ainsi décrite, basée sur l'action des fluorones à fonctions phénoliques, sur les restes glucidiques des acides nucléiques cellulaires, apporte une contribution à l'étude histochimique des noyaux et des divers constituants des cellules et des tissus; elle est en outre basée sur des réactions chimiques bien établies et exposées plus loin. Par contre la réaction de Feulgen n'est positive qu'avec l'acide thymonucléique et l'explication chimique de la réaction ne semble pas satisfaisante.

Feulgen attribuait sa réaction à la présence d'une fonction aldéhydique d'un hexose (glucal) qui recolore le réactif fuchsine sulfureux; or ce sucre est, selon LEVENNE (55), un pentose (ribodésose) ne possédant pas de fonction aldéhydique mais pseudo-aldéhydique selon LISON (59). De plus,

l'action donnée par le reste aldéhydique du ribodésosse est peu conforme avec la réalité, car de nombreux sucres à fonction aldéhydique ne recolorent pas le réactif. S'il y a recoloration elle est due le plus souvent à des phénomènes secondaires.

Notre réaction présente l'avantage de donner des réactions colorées avec différents sucres. A côté de l'étude de la chromatine par le ribodésosse, elle permet du même coup de mettre en évidence le ribose de l'acide zymonucléique dans le cytoplasme et dans certaines formations de métachromatine.

Elle permet en outre l'étude de certains nucléoprotides. Elle révèle en particulier dans le nucléole la présence d'un nucléo-protide dont le sucre est différent du ribodésosse et que l'on pourra déterminer un jour nous l'espérons, grâce à des échelles colorimétriques obtenues à partir de sucres de concentration convenable.

Elle permettra sans doute enfin par l'étude des tissus pathologiques de donner des indications sur l'action de certaines substances toxiques ou de certaines toxines microbiennes qui clivent ou modifient les nucléoprotéides du noyau ou du cytoplasme. Elle peut mettre en évidence *in vitro* l'acide tuberculinique de la tuberculine parce qu'il renferme du ribodésosse, ce qui confirme les résultats obtenus par divers auteurs (JOHNSON, BROWN, COGHILL, SEIBERT et ses collaborateurs) utilisant des techniques différentes (97) et (9).

En résumé, les fluorones par leurs propriétés de donner avec les sucres des réactions colorées, permettent d'étudier sous un jour nouveau, du point de vue morphologique, histophysiologique et histochimique, divers constituants cellulaires et en particulier le noyau grâce à la coloration bleu violacé ou violette qu'elles donnent avec le ribodésosse, mais pour être nucléale, notre réaction n'est valable qu'après une hydrolyse préalable. Elle a en outre l'avantage de mettre en évidence dans les mêmes conditions un sucre provenant du nucléole. Telles sont les conclusions auxquelles nous étions parvenus (97).

## II. — Résultats obtenus sur les acides nucléiques.

Il nous a paru intéressant de vérifier les résultats histologiques par l'étude de l'action des fluorones sur les acides nucléiques obtenus à l'état pur (9). Ces derniers sont plus faciles à caractériser que les nucléoprotéides des noyaux et des cytoplasmes qui ne sont pas toujours libres, ni à l'état de pureté suffisante. Dans la cellule, ils sont mélangés ou combinés à d'autres matières protidiques ou minérales qui peuvent donner avec les fluorones des réactions de précipitation colorées (8 et 58). L'acide zymonucléique que nous avons employé est un acide de levure de bière du commerce, qui donne les réactions caractéristiques avec le  $\beta$  naphthol sulfurique ainsi que le tryptophane chlorhydrique (bleu outre-mer et vert clair) (89). L'acide thymonucléique a été préparé par nous à partir d'extraits totaux de thymus. Nous avons employé la technique de LEBEAU et COURTOIS. La séparation et le lavage de l'acide libéré en milieu alcoolique ont été faits par centrifugation. Les culots ont été successivement remis en suspension dans l'alcool à 96°, puis dans l'éther officinal jusqu'à purification complète. Le produit est séché ensuite à l'étuve à 60°. Les réactions de contrôle au  $\beta$  naphthol sulfurique, au tryptophane, et au réactif de DISCHE (46) ont été positives (brun rouge, rose rubis et bleu). Nous n'avons pas cherché à obtenir un bon rendement mais les produits les plus purs possibles.

a) *Expérience sur papier filtre.* — Les deux acides ont été mis en solution chlorhydrique; la concentration de l'acide zymonucléique a été faite intentionnellement plus forte. On dilue avec de l'acide chlorhydrique normal et on chauffe légèrement au bain-marie pour hydrolyser. Sur des papiers filtres épais, on dépose une goutte de chaque acide, peu après on verse une goutte de réactif de façon à ce que l'auréole formée déborde la goutte primitive. Après quelques minutes, on lave rapidement à l'alcool chlorhydrique à un pour cent, puis à l'eau ordinaire. On fait virer dans une solution de

carbonate de soude à un pour cent afin de revenir en milieu légèrement alcalin. On obtient les colorations suivantes.

|                              | 9 méthyltrihydroxyfluorone                                       | 9 phényltrihydroxyfluorone                      |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Eau distillée + fluorone     | tache mauve                                                      | tache mauve rosé                                |
| A. thymonucléique + fluorone | tache violet améthyste dont le contour est net sur un fond mauve | tache bleu violacé nette sur un fond mauve rosé |
| A. zymonucléique + fluorone  | tache violet pâle dont le contour est peu net sur un fond mauve  | légère tache mauve sale sur un fond mauve rosé  |

L'acide thymonucléique donne une réaction plus marquée que l'acide zymonucléique. Il y a une ressemblance marquée entre les colorations obtenues sur papier et celles obtenues sur les coupes. La phényl trihydroxyfluorone marque bien la différence entre les deux acides, tant par la nuance que par l'intensité.

b) *Expériences en tubes à essai.* — On choisit quatre tubes à essais de même diamètre  $18 \times 18$  et faits d'un même verre, on ajoute les réactifs suivants :

| Tubes                                                    | 1                  | 2                  | 3                  | 4                  |
|----------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| $\text{SO}_4\text{H}_2$ à 15 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> | 10 cm <sup>3</sup> | 10 cm <sup>3</sup> | 10 cm <sup>3</sup> | 10 cm <sup>3</sup> |
| A. thymonucléique                                        | 1 pointe de canif  |                    | 1 pointe de canif  |                    |
| A. zymonucléique                                         |                    | 1 pointe de canif  |                    | 1 pointe de canif  |

Agiter et porter au bain-marie pendant 10 minutes

Ajouter les réactifs, { phényltrihydroxy- méthyltrihydroxy-  
mélanger et porter au } fluorone fluorone  
bain-marie 3 minutes { X à XX gouttes X à XX gouttes

Ajouter à la pipette une solution alcaline (NaOH) pour revenir en milieu légèrement alcalin

Il se développe dans { Bleu Rosée ou Violette Mauve à  
la solution surnageant } violacé jaune rosé jaune rosé  
une coloration..... (A. thymo.) (A. zymo.) (A. thymo.) (A. zymo.)

Dans le fond du tube on a un précipité blanchâtre d'acide nucléique non combiné, de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  et de bases.

Ces réactions *in vitro* permettent de différencier l'acide thymonucléique de l'acide zymonucléique. Les colorations sont identiques à celles obtenues sur coupes et sur papier filtre.

### III. — Résultats obtenus avec les sucres.

Les acides nucléiques sont représentés selon les auteurs par des groupements P-S-B associés de façons diverses (89); P = acide phosphorique; S = sucre (ribose et ribodésose); B = bases puriques et pyrimidiques. Par hydrolyse on peut mettre en liberté les différents éléments; à l'aide des fluorones nous avons cherché quel est le produit qui a donné naissance à la réaction colorée observée dans le noyau formé de nucléoprotéides.

a) Les ions *phosphoriques* ne donnent pas avec la fluorone des réactions colorées même en faisant varier le pH; Claude P. BLANCPAIN a étudié la méthyltrihydroxy fluorone (8 et 58) et nous avons essayé le phényl trihydroxy fluorone. Les résultats sont négatifs.

b) Les bases *puriques* et *pyrimidiques* essayées ne donnent pas de réactions colorées.

| Eau distillée | Guanine                 | Xanthine       | Hypo-xanthine           | Uracile             | Urée                    | A. Urique               |
|---------------|-------------------------|----------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| Rose faible   | Pas de coloration nette | ↓ Blanc saumon | Solut. clairejaune rosé | Rose sale peu nette | Pas de coloration nette | Pas de coloration nette |

c) Avec les *sucres* nous avons obtenu des réactions colorées intenses pour une faible concentration en milieu légèrement alcalinisé.

| Monosaccharides |                 |                |        |         |              |                |               |               |                 |         |         |
|-----------------|-----------------|----------------|--------|---------|--------------|----------------|---------------|---------------|-----------------|---------|---------|
| Pentoses        |                 |                |        | Hexoses |              |                |               | Disaccharides |                 |         |         |
| Aldoses         |                 |                |        | Aldoses |              | Cétose         |               | Divers        |                 |         |         |
| Ribose          | Ribodé-<br>sose | Arabi-<br>nose | Xylose | Glucose | Manno-<br>se | Galac-<br>tose | Fruc-<br>tose | Maltose       | Saccha-<br>rose | Lactose | ycogène |

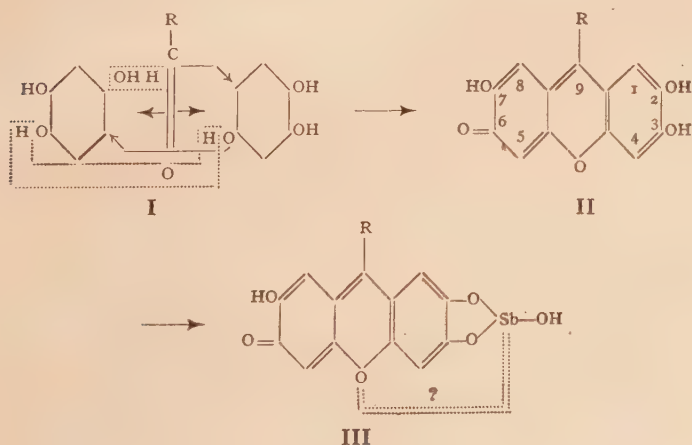
En présence de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  et de phényltrihydroxyfluorone, puis en revenant en milieu légèrement alcalin on a des colorations

|               |                 |                  |       |                 |               |       |       |                            |       |          |                |
|---------------|-----------------|------------------|-------|-----------------|---------------|-------|-------|----------------------------|-------|----------|----------------|
| Jaune<br>rosé | Bleu<br>violacé | Rouge<br>violacé | Rouge | Rouge<br>orangé | Rouge<br>rosé | Rouge | Rouge | Jaune<br>orangé<br>à rouge | Rouge | Violette | Lilas<br>rouge |
|---------------|-----------------|------------------|-------|-----------------|---------------|-------|-------|----------------------------|-------|----------|----------------|

Les réactions colorées des sucres vis-à-vis de la méthyl-trihydroxyfluorone sont à peu près identiques. Les résultats semblent prouver que c'est l'ose qui entre en réaction avec les fluorones pour donner des réactions colorées trouvées précédemment dans les noyaux cellulaires.

#### IV. — Essai d'interprétation des résultats.

Les fluorones résultent de la condensation selon les schémas I et II que nous proposons (2 molécules d'oxyhydroquinone pour une molécule d'aldéhyde).



Le corps représenté par le schéma II possède :

- a) 3 oxydryles OH phénoliques; les oxydryles OH en 2 et 3 possèdent des propriétés spéciales pour l'antimoine. La fonction OH en 7 ne semble pas jouir des mêmes propriétés;
- b) une fonction cétone (quinone 6);
- c) un pont oxydique entre 4 et 5.

La fonction cétone (quinone) n'est pas une cétone vraie. Cette fonction ne semble pas avoir d'action sur le sucre, par ailleurs elle ne semble pas être très active: par traitement avec le chlorhydrate d'hydroxylamine au bain-marie pendant 3 heures en milieu alcoolique en présence d'oxyde de zinc, nous n'avons pas obtenu l'oxyme. Il semble que cette fonction n'intervient pas, car d'autres corps comme les naphhtols, la résorcine, donnent avec les sucres des réactions colorées sans avoir cette fonction.

L'oxygène du pont ayant tendance à fixer  $\text{ClH}$ , en donnant des sels type oxonium, pourrait donner des réactions dues au chlore; il n'en est rien, car si on précipite la fluorone par de l'antimoine trivalent on obtient le corps représenté selon le schéma III. Ce dernier précipité à chaud de la solution chaude d'antimoine (émétique) et lavé successivement à l'alcool, puis à l'eau tiédie, ne présente pas de chlore dans sa molécule: ceci est prouvé par le fait que le poids moléculaire théorique du complexe antimonié du schéma III, calculé pour  $\text{R} = \text{C}_6\text{H}_5$ , a été vérifié par de très nombreux résultats tous concordants provenant de la méthode de dosage pondéral de l'antimoine par la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone que nous avons exposés au début de ce travail. L'absence du chlore est également vérifiée quand on détruit le complexe par l'acide nitrique concentré et qu'on additionne de nitrate d'argent. Ce complexe dissous, donne avec les sucres en milieu alcalin une réaction colorée. Il semble donc que les réactions colorées données par les fluorones vis-

à-vis des sucres soient dues aux fonctions phénols : si on bloque les fonctions OH en ortho par de l'antimoine trivalent, on obtient un complexe. Si on le dissout dans un acide dilué au 1/10 et que l'on ajoute par exemple du lactose en ayant soin de revenir en milieu alcalin, on aperçoit une coloration violette. Si on inversait l'expérience en faisant agir une solution alcoolique de fluorone sur une solution de lactose et qu'on passe en milieu légèrement alcalinisé par la soude, la coloration violette se développerait et on aurait un précipité abondant; par addition d'une solution d'antimoine trivalent la coloration ne change pas; si on abaisse le pH en acidifiant par l'acide sulfurique au voisinage de pH 4, il se forme un précipité brun rougeâtre. Si la concentration est faible on a une coloration brun rouge. Ce précipité n'est plus rouge vif comme le complexe antimonié du schéma III. Si on le place en milieu légèrement alcalin il redonne la coloration violette; il semblerait qu'au voisinage de pH 4 l'antimoine déplace les molécules de l'ose fixé aux OH phénoliques par leur fonction réductrice et qu'en milieu alcalin léger, l'antimoine soit déplacé à son tour et l'ose fixé de nouveau sur les OH en 2 et 3. Supposant que les sucres donnent avec les phénols des réactions colorées, nous avons fait réagir différents sucres sur le triphénol à fonctions OH en ortho ayant servi à la préparation des fluorones, c'est-à-dire l'oxyhydroquinone. Et nous avons obtenu les résultats colorimétriques suivants :

| Ribose                         | Arabinose                           | Glucose       | Fructose      | Maltose                        | Saccharose                      | Lactose  | Raffinose       |
|--------------------------------|-------------------------------------|---------------|---------------|--------------------------------|---------------------------------|----------|-----------------|
| Rose violacé<br>→ brun<br>noir | Rouge<br>violacé<br>→ brun<br>rouge | Jaune<br>rosé | Jaune<br>rosé | Rose<br>violacé<br>peu intense | Jaune<br>violet à<br>jaune rosé | Violette | Rose<br>violacé |

*Remarque.* — En milieu alcalin l'oxyhydroquinone s'oxyde vite, la coloration doit être notée de suite, sinon elle change rapidement en donnant des colorations brun noirâtre.

Si les sucres donnent des réactions colorées avec l'oxyhydroquinone il n'est pas illogique de penser que les sucres

donnent des réactions colorées avec des fluorones à fonctions phénoliques. La coloration donnée par les fluorones ne peut aucunement être due à l'oxyhydroquinone provenant de la décomposition de la fluorone, car on sait que l'oxyhydroquinone ne donne pas de précipité avec l'antimoine, malgré la présence des OH en ortho, ce qui n'est pas le cas, puisque nous avons observé des précipités rouges avec de l'antimoine.

Il convient donc de replacer les résultats trouvés par nous parmi les réactions colorées classiques des sucres : beaucoup de phénols et de polyphénols donnent des réactions de colorations.

a) L' $\alpha$  naphthol sulfurique dans la réaction de MOLISCH, UDRANSKY (68) donne avec les restes glucidiques une coloration violet-rouge.

b) Le thymol sulfurique donne une coloration rouge carmin (89).

c) La résorcine chlorhydrique dans la réaction de SELIVANOFF permet de différencier les aldoses des cétooses qui donnent une coloration rouge intense devenant foncée, alors que les aldoses donnent une coloration rosée, jaunâtre très faible (89).

d) Le  $\beta$  naphthol sulfurique indiqué par P. THOMAS (89) donne avec les pentoses une coloration bleu-outremer, sauf le ribodésose qui donne une coloration brun rouge. Avec les hexoses la coloration est verdâtre.

e) L'orcine chlorhydrique donne avec les pentoses, trioses, heptoses, une coloration bleu violacé, avec les hexoses une coloration orangé rougeâtre (89).

f) La phloroglucine chlorhydrique donne avec les pentoses une coloration rouge foncé, les hexoses ne donnent pas de coloration, sauf le galactose, qui se comporte comme un pentose (89).

g) Le naphthol-résorcine chlorhydrique par chauffage donne avec le galactose une coloration lilas; le fructose, le

sorbose, une coloration pourpre intense. L'arabinose, le xylose, une coloration rouge violacé à fluorescence verte (89).

En résumé, nous pouvons affirmer que les fluorones sont des réactifs colorés des sucres, mais elles ne permettent pas, comme dans la réaction de SELIVANOFF, de différencier des groupes sucrés : les réactions sont très différentes pour chacun des sucres du même groupe. Le fait remarquable est que deux fluorones (la 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone et la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone) ont la propriété de donner une réaction colorée (violettes ou bleu violacé) assez intense qui permet de différencier l'acide thymonucléique de l'acide zymonucléique, réactif d'autant plus précieux qu'on peut réaliser la coloration sur des coupes histologiques. On peut espérer un jour obtenir une méthode de dosage colorimétrique des acides ribodésose-nucléiques aussi sensibles que la méthode utilisant le réactif de DISCHE (45 et 46). La seule objection que l'on puisse élever contre les fluorones : c'est de donner avec le lactose une coloration violette à peu près semblable à celle de l'acide thymonucléique, ce qui *a priori* semble devoir diminuer la spécificité des fluorones vis-à-vis de la substance nucléale. Il n'en est rien, si on se place dans les conditions histologiques indiquées. L'hydrolyse préalable et le lavage permettent de garder à la réaction toute sa spécificité à l'égard du ribodésose toujours présent dans la substance nucléale et d'apporter ainsi à l'histologie une réaction nouvelle ayant la valeur de celle de Feulgen (96).



## TROISIÈME PARTIE

### APPLICATION DES FLUORONES A LA LOCALISATION HISTOLOGIQUE DES MÉDICAMENTS ANTIMONIÉS INJECTÉS DANS L'ORGANISME

#### I. — Effets de l'Antimoine dans l'organisme

La thérapeutique de l'antimoine n'est pas toujours sans inconvénients. L'antimoine peut donner lieu à des accidents secondaires, soit qu'on prolonge le traitement, soit qu'on ait affaire à un malade trop sensible à ce médicament. Sans vouloir faire la toxicologie de l'antimoine, nous étudierons tout d'abord l'effet de quelques antimoniés sur l'organisme, surtout dans les limites thérapeutiques où ils deviennent toxiques. Nous étudierons ensuite les lésions qu'ils peuvent provoquer et tâcherons de préciser enfin la localisation chimique de l'antimoine dans l'organisme.

Nous avons utilisé comme animaux d'expériences le Cobaye et quelquefois le Chien, sur lequel l'antimoine provoque des réflexes et des réactions très comparables à celles exercées sur l'homme.

Comme médicaments antimoniés nous employons l'émétique et la fouadine. L'émétique inscrit à la Pharmacopée française de 1937, contrairement aux autres médicaments antimoniés qui n'y figurent pas encore, nous servira de type, c'est d'ailleurs le plus employé et le plus ancien. L'émétique est administré par la voie intraveineuse chez l'adulte et intramusculaire ou hypodermique chez l'enfant. L'école

anglaise emploie de préférence son homologue sodique (le stybial) administré par la voie intramusculaire. L'école italienne en raison des effets rapides de l'émétique lui conserve toujours sa faveur. Le formulaire pharmaceutique du Service de Santé militaire français (36) recommande son emploi en solution de 1 g pour 1000 dans du sérum physiologique; nous utilisons donc une solution d'émétique à 1 g 376 correspondant à 5 mg d'antimoine par  $\text{cm}^3$  injecté chez le Chien par voie intraveineuse et chez le Cobaye par voie sous-cutanée, intramusculaire ou intrapéritonéale.

La fouadine utilisée est celle de la maison Bayer, boîte pour adulte contenant une ampoule de 1  $\text{cm}^3$  5, une ampoule de 3  $\text{cm}^3$  5, et 8 ampoules de 5  $\text{cm}^3$ ; on emploie 1  $\text{cm}^3$  pour 10 kilogrammes d'animal. Ne pouvant diluer ce médicament pour l'administrer aux Cobayes, nous l'employons pour provoquer des intoxications aiguës.

Parfois nous injectons des antimoniaux insolubles comme le sulfure d'antimoine en solution isotonique à raison de 20 mg d'antimoine par  $\text{cm}^3$  ou bien des suspensions de complexe fluorone-antimoine dans du sérum physiologique.

#### PRÉPARATION DES ANIMAUX.

*Cobaye A* (femelle). Poids : 438 g; injection intrapéritonéale de 1  $\text{cm}^3$  d'émétique par jour; après introduction de 70 mg d'antimoine on sacrifie l'animal.

*Cobaye B* (femelle). Poids : 404 g. Injection de 1  $\text{cm}^3$  tous les deux jours. Après administration totale de 120 mg, on sacrifie l'animal profondément touché.

*Cobaye C* (femelle). Poids : 508 g. Injection de 1  $\text{cm}^3$  tous les jours (sous-cutanée et intramusculaire); après une dose de 120 mg répartie en 32 jours, l'animal est sacrifié.

*Cobaye D* (femelle). Poids : 500 g. Injection de 30 mg d'antimoine; 3 heures après on sacrifie l'animal.

*Cobaye E* (femelle). Poids : 425 g. Injection de 50 mg d'antimoine en une dose. L'animal mourut 3 heures après injection.

*Cobaye F* (femelle). Poids : 440 g. Après ligature des uretères, on injecte à l'animal toujours anesthésié 30 mg d'antimoine. Après avoir observé l'élimination de l'antimoine par les glandes salivaires, 4 heures après la ligature on sacrifie l'animal pour en prélever les organes.

*Cobaye G* (femelle). Poids : 450 g. Injection de 50 mg; après 2 heures on sacrifie l'animal. A l'autopsie on constate la présence de deux embryons non parvenus au terme de leur développement.

*Cobaye H*. Poids : 440 g. Injection intradermique en deux fois de 20 cm<sup>3</sup> d'une suspension de complexe fluorone-antimoine dont la toxicité s'est révélée très faible. L'animal a été sacrifié au deuxième jour en parfaite santé.

*Cobaye I* (mâle). Poids : 430 g. Deux injections intracardiales de 20 mg de sulfure d'antimoine, l'animal après 24 heures est sacrifié.

*Cobaye J*. Poids : 500 g. Injections sous-cutanée de 70 mg d'antimoine à raison de 1 cm<sup>3</sup> tous les jours; l'animal est sacrifié au bout de 15 jours.

*Cobaye K* (femelle). Poids : 460 g. Injection de 40 mg d'antimoine, un cm<sup>3</sup> tous les jours.

*Cobaye L* (femelle). Poids : 450 g. Injection de 25 mg d'antimoine sous la peau du cou, le méat urinaire ayant été préalablement collodionné. L'animal a été sacrifié au bout de trois heures.

*Chien*. Poids : 4 kg. Injection totale de 100 mg d'antimoine en quatre fois, après la ligature des uretères; après constatation de l'élimination par les glandes salivaires, on sacrifie l'animal pour en prélever les organes.

SYMPTÔMES OBSERVÉS AU COURS DE LA MÉDICATION AVEC L'ÉMÉTIQUE.

Chez les Cobayes traités par l'émétique à la dose médicamenteuse de 5 mg d'antimoine métalloïdique par jour, nous avons observé les symptômes suivants : après la première injection, l'animal présente des frissons ; au bout d'un quart d'heure il urine abondamment sans trace d'antimoine, après 24 heures l'urine en renferme des traces évaluées approximativement à 0 mg 25 par litre par comparaison avec une solution d'émétique témoin. On n'observe pas de réflexe vomitif. La salive contient des traces faibles d'antimoine. Le Cobaye paraît bien supporter le traitement. Vers le septième jour, on note une hypertrophie des ganglions des membres inférieurs. Les poils restent brillants et tombent insensiblement. Quand la dose atteint 50 mg d'antimoine, l'« *ecthyma stibiæ* » apparaît par plaques sur les flancs et sous le ventre, non localisé au point d'injection. L'animal paraît réagir ; de jour en jour les plaques se multiplient pour se résorber ensuite vers le vingtième jour. L'animal ne semble pas s'accoutumer à l'antimoine. Si on augmente la dose les plaques d'« *ecthyma stibiæ* » se reforment, et l'animal ne paraît pas supporter la double dose de 10 mg d'antimoine injectée tous les deux jours. Le poil tombe d'une façon plus sensible, tout en restant brillant. Nous revenons à la dose primitive de 5 mg injectée tous les jours, puis tous les deux jours. Quand la dose de 120 mg d'antimoine est atteinte, nous arrêtons le traitement tout en observant l'animal. De nombreux troubles se manifestent. L'animal semble vaciller sur ses pattes. La tête est levée en l'air. Les yeux du Cobaye se fixent dans le vague ou bien semblent tourner dans le vide. Au moindre bruit l'animal tressaille ; il fuit le grand jour. Vers la fin l'animal présente une légère paresse avec une paralysie graduelle du système nerveux. Il se met en boule. Les poils du museau se hérissent. Le train postérieur présente une parésie accusée. Les mictions d'urine sont fré-

quentes, puis elles ne sont plus contrôlées, l'animal est très abattu et bientôt il meurt, le plus souvent en défécant.

Au cours de ce traitement on note un amaigrissement considérable. Les animaux perdent un tiers de leur poids primitif, alors que le témoin a augmenté du quart de son poids primitif. Aux fortes doses, nous n'avons pas observé chez le Cobaye de réflexe vomitif; chez le Chien après une dose d'environ 100 mg d'antimoine, nous l'avons observé au bout de plusieurs heures; ce cas a été déjà signalé (26). L'émétique vomitif par excellence dans la médication « per os », ne provoque le réflexe vomitif chez le Chien qu'à une bien plus forte, plus du double de la quantité de 50 mg d'émétique correspondant au seuil d'action vomitive étudié par CLOETTA chez le Chien (23).

#### LÉSIONS ANATOMIQUES ET MODIFICATIONS FONCTIONNELLES.

*Chez les Cobayes*, après injection d'émétique, on ne note pas de lésions apparentes du tube digestif semblables à celles signalées dans l'empoisonnement aigu (26). Nos observations, ceci mis à part, rappellent celles déjà signalées par les toxicologues, mais les phénomènes observés sont plus atténués.

L'estomac et l'intestin ont perdu leur résistance et leur élasticité normales. Ils deviennent mous et flasques au toucher et se déchirent très facilement lors du prélèvement des organes. Sur l'estomac, nous avons observé une petite plaque rouge formée par du sang infiltré, bien que l'animal n'ait pas reçu de médicament par la voie digestive.

Les poumons sont congestionnés et de couleur orange et violacée.

Le foie est assez gros, gorgé de sang et de couleur foncée.

Les reins sont parfois congestionnés, parfois comprimés et de forme polyédrique.

Les surrénales sont jaunes et assez friables.

Les autres organes ne présentent rien de particulier à l'autopsie.

## ÉLIMINATION DE L'ANTIMOINE DE L'ORGANISME.

L'antimoine ingéré « per os », s'élimine par les fèces et surtout par les urines. Quand l'antimoine est injecté à dose médicamenteuse par voie hypodermique, intramusculaire ou intrapéritonéale, l'élimination se fait aussi rapidement par les mêmes voies. Nous avons trouvé à côté de ces processus normaux, deux autres modes d'élimination peu signalés : l'élimination par la peau et les poils, et l'élimination par les glandes salivaires.

L'élimination par la peau s'effectue sous forme « d'ecthyma stibiæ ». Ces vésicules apparaissent lentement, en un certain point de la peau sous forme d'un léger nodule. Les poils tombent peu à peu en cet endroit. A leur base on voit apparaître quelques points rouges. Puis bientôt une petite pustule s'ouvre. Elle ressemble à une pustule variolique aux bords taillés à pic. Le derme en cet endroit est comme lysé. Un liquide jaunâtre légèrement purulent exsude et vient se concréter à la base des poils environnants qui tombent peu à peu par touffes. Ces touffes prélevées après réaction à la fluorone présentent des traces importantes d'antimoine déposées en couches successives dans la gangue formée. la base de certains poils présente dans le bulbe des traces d'antimoine. Nous y reviendrons plus loin.

L'élimination par les glandes salivaires a été observée à la suite de travaux d'histochimistes comme P. CASTEL (16), BRABANT (11) etc. Ils avaient signalé la présence du bismuth et du fer au niveau de ces glandes. En recherchant ce mode d'élimination de l'antimoine chez nos Cobayes, nous en avons trouvé des traces dans la salive. Pour être plus sûr de ce mode d'élimination par ces glandes, nous ligaturons les deux uretères d'un Cobaye anesthésié au chloroforme. Après injection d'émétique, nous avons retrouvé l'antimoine dans la salive. L'uretère d'une Chienne de 4 kg est ligaturé soigneusement, un thermostat électrique maintient une température constante; on dénude la saphène gauche de l'animal

et on place l'embout. En notant l'heure (16 h. 30) on injecte d'abord 25 mg d'antimoine (5 cm<sup>3</sup> d'émétique), puis, dix minutes après, 25 mg de plus. On anesthésie l'animal au chloroforme; après une large laparatomie, on repère les deux urètères, par leurs attaches aux reins et à la vessie préalablement vidée. On ligature ces urètères. L'animal refermé avec des pinces à forcipressure est prêt pour l'expérience. On injecte encore à 17 h. 30 25 mg d'antimoine, puis, à 18 h., 25 mg de plus. L'animal a reçu en tout 100 mg d'antimoine.

La salivation a commencé une demi heure après la première injection. Épaisse et visqueuse la salive est recueillie sur des carrés de papier filtre toutes les 5 minutes. On recherche l'antimoine par une solution de fluorone qui donne une coloration rouge. A 17 h. 10 on note des traces d'antimoine, ces quantités vont en augmentant. A 18 h. 15 la présence de l'antimoine semble être maximum, elle se maintint quelque temps lorsqu'à 18 h. 35 l'animal vomit abondamment; le liquide recueilli est jaunâtre et clair. Il présente de faibles traces d'antimoine provenant sans doute de la salive entraînée lors du vomissement. Cet événement inattendu nous fit arrêter l'expérience de l'élimination. L'animal moribond est sacrifié à 18 h. 45.

L'autopsie révèle un foie fortement congestionné, une rate gris noirâtre et dure, des poumons fortement congestionnés. L'estomac et l'intestin sont pleins de liquide jaune clair très abondant. La vessie est toujours vide et les reins sont dilatés par une rétention forcée.

#### APERÇU HISTOLOGIQUE DE L'ACTION DE L'ANTIMOINE SUR QUELQUES ORGANES.

Chez les animaux soumis au traitement antimonié à longue durée, et à l'intoxication aiguë, on peut observer des actions dues au médicament.

**LE FOIE.** — Organe antitoxique important par ses éléments du système réticuloendothélial, le foie présente des modifications notables au cours des traitements médicamenteux de longue durée.

Les veines centro-lobulaires sont fortement congestionnées, avec épaississement des parois paraissant être d'origine conjonctive. A partir de ces veines centro-lobulaires, il y a départ des travées conjonctives qui s'insinuent vers les travées de Remak. Un début de sclérose s'installe, on l'observe dans certains espaces portes et dans certains lobules, les travées de Remak sont dissociées par le tissu conjonctif au niveau de la veine centro-lobulaire, dont les environs présentent des aspects anarchiques.

Les cellules hépatiques sont touchées, elles paraissent très vacuolisées, par contre les canalicules biliaires et les artérioles ne sont pas touchées. Il y a une congestion importante des vaisseaux avec extravasion de leurs éléments, ainsi que des veines centro-lobulaires.

Chez certains Cobayes, le foie ne présente pas d'envahissement conjonctif lors de l'intoxication rapide; on n'observe qu'une congestion importante de tout l'organe et dans certains capillaires une mobilisation des cellules de Kuppfer.

Dans les cas où la médication était prolongée, les lésions hépatiques étaient plus marquées.

Le foie est augmenté de volume et de coloration plus foncée. Histologiquement il présente des plages de dégénérescence non localisée, où le cytoplasme des cellules hépatiques est mal coloré et mal délimité, tandis que les noyaux sont tantôt hypochromatiques, tantôt hypertrophiés et tantôt en pycnose. Ailleurs les cellules sont hyperplasiques et présentent encore des irrégularités nucléaires et l'aspect de la dégénérescence grasseuse au début. Certaines autres renferment des boules d'un pigment de dégénérescence; il en est de même pour les cellules de Kuppfer. Ainsi donc les cellules hépatiques sont atteintes de lésions dégénératives allant de la dégénérescence grasseuse à la nécrose; ce sont d'ailleurs

les lésions essentielles observées dans de nombreuses intoxications (bismuth, mercure, arsenic, etc.).

Il ressort de ces constatations que l'emploi de l'antimoine ne doit être préconisé qu'avec beaucoup de prudence. Même injecté à petites doses on ne doit pas le prolonger au delà d'une certaine limite.

**LA RATE.** — Organe érythrolytique par excellence et doué d'un grand pouvoir phagocytaire grâce aux cellules du réticulum de sa pulpe et des cordons de Billroth, c'est à son niveau que les médicaments sont fixés et nous observons que, après le traitement antimonié, la rate au faible grossissement paraît normale, sauf que les sinus sont fortement dilatés. En examinant au fort grossissement, on voit que les artères sont normales, tandis que les sinus sont très larges, parfois ces derniers engorgés d'éléments desquamés de toutes sortes, d'ocrocytes en particulier.

Dans les cas d'intoxication aiguë plus accusée, la paroi des artères est légèrement épaissie; on note la présence de pigments plus nombreux mais très dispersés et non groupés en plages comme dans la rate normale. Les sinus présentent une forte congestion avec destruction de globules rouges accompagnée de la formation de symplastés.

**LES REINS.** — Dans les tubes contournés I et II, les cellules sont vacuolisées et desquamées. Dans le tube droit il n'y a pas de cylindres, ni de desquamation; les cellules ne paraissent pas cependant absolument normales. Il semblerait que dans les tubuli contorti I les cellules aient perdu en partie leur bordure en brosse en présentant une légère dégénérescence apicale.

Les glomérules de Malpighi paraissent un peu rétractés, cependant la capsule n'est pas épaissie et les capillaires ne sont pas très congestionnés. Dans certains cas aigus les reins ont un aspect normal, non congestif, sauf dans quelques tubes contournés où la bordure en brosse y est abimée. Les cellules sont légèrement vacuolisées, dans certains tubes, l'aspect

dégénératif vacuolaire est plus marqué, dans certains autres il y a une dégénérescence des parties apicales des cellules qui donnent des cylindres granuleux.

LES POUMONS. — Les poumons présentent une énorme congestion.

L'ESTOMAC et l'INTESTIN. — Nous avons trouvé à leur niveau des phénomènes beaucoup plus atténués. La muqueuse est cependant touchée. Les cellules glandulaires sont légèrement dissociées. Le chorion et la sous-muqueuse sont presque normaux.

LES GLANDES PARÔTIDES. — Il y a dans ces glandes des desquamations dans les tubes glandulaires.

*Chez le Chien.* — Dans la rate on note une congestion énorme, beaucoup de pigments ocreux en plages très nombreuses. Les capillaires et les veines sont très dilatés. Dans le rein les tubes urinaires sont abîmés et dans un état de grand délabrement. Les glandes salivaires présentent des tubes excréteurs desquamés. Le foie est fortement congestionné surtout au niveau des vaisseaux et des veines centrolobulaires. Les capillaires sont dilatés et les cellules hépatiques sont vacuolisées.

Par cet aperçu on voit que les médicaments antimoniés ne sont pas sans effets nocifs sur l'organisme. Ils doivent être utilisés avec beaucoup de prudence en tenant compte de l'état du malade, de l'âge, de son poids et de sa sensibilité à l'égard du médicament. (Les Africains supportent beaucoup plus mal l'antimoine que les Européens.) Il faut établir une dose convenable et ne pas prolonger la médication au delà d'un certain temps. L'antimoine (émétique) est très caustique pour les organes. Les cellules de l'organisme ne semblent pas s'accoutumer à un traitement antimonié prolongé. Avec le temps l'intolérance s'exagère, et ceci explique les accidents provoqués par certains médicaments antimoniés.

## II. — Les Réactifs de l'Antimoine

### 1<sup>o</sup> GÉNÉRALITÉS.

La recherche de l'antimoine, sa caractérisation et sa localisation constituent des problèmes importants, aussi bien au point de vue chimique et histochimique, qu'au point de vue toxicologique, médical et pharmaceutique.

Depuis près d'un siècle, l'analyse qualitative minérale n'a guère connu de modifications profondes dans la méthode établie par ses fondateurs; ce n'est que dans ces trente ou quarante dernières années qu'on note quelques tentatives d'emploi de réactifs organiques dans l'analyse qualitative. La sensibilité de ces réactifs est telle qu'on peut les utiliser pour détecter des quantités minimales de substance. Grâce à l'amélioration apportée aux méthodes anciennes par les réactions à la touche, à la goutte ou mieux les stilliréactions (terme proposé par MM. R. DELABY et J. A. GAUTIER) (27), on possède des techniques plus précises, plus rapides et plus élégantes. Le perfectionnement de l'analyse microchimique due surtout à F. FEIGL et à d'autres auteurs, a incité à rechercher de nouveaux réactifs plus sensibles et plus spécifiques. Depuis ces dix dernières années ces réactifs sont devenus si nombreux, que l'Union internationale de Chimie s'est préoccupée dès 1935 d'en établir une sélection. Le premier rapport, datant de 1938, a donné une liste provisoire de réactifs. Un travail critique et expérimental doit faire l'objet d'un deuxième rapport. M. le professeur DELABY, chargé d'une partie de cette tâche, proposa à Mlle LIÉVIN l'étude critique et expérimentale des stilliréactions de l'antimoine, ce qu'elle fit dans une thèse très détaillée. L'auteur après avoir fait une étude bibliographique de très nombreux réactifs, fait une sélection des plus intéressantes en s'appuyant sur deux des facteurs les plus importants : la spécificité ou sélectivité et la sensibilité, tout en tenant compte

de la nature du réactif, du mode opératoire de la réaction et des possibilités pratiques.

Les réactions choisies sont groupées de la façon suivante :

|           |   |                                         |
|-----------|---|-----------------------------------------|
| Oxydation | { | Thiosulfate de sodium                   |
|           |   | Rhodamine B                             |
| Réduction | : | Acide phosphomolybdique                 |
|           | { | Chlorure de sodium                      |
|           |   | Antipyrine + Iodure de potassium        |
| Complexe  | { | Pyridine + Iodure de potassium          |
|           |   | Pyrogallol                              |
|           |   | Pyrocatéchol                            |
|           |   | Méthyl 9, trihydroxy 2, 3, 7 fluorone 6 |

Ces réactifs assez spécifiques et sensibles permettent de rechercher les différentes valences de l'antimoine et l'auteur recommande, après les avoir expérimentés la rhodamine B et la 9 méthyl 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone lors des stilli-réactions de l'antimoine.

Notre but était différent. Aussi le long travail bibliographique et expérimental effectué par nous ne fut-il pas vain. Du fait de la guerre nous n'avons eu connaissance du travail de Mlle LIÉVIN qu'en juin 1943, date à laquelle elle nous fit directement parvenir sa thèse, ce dont nous tenons à la remercier vivement. Après Mlle LIÉVIN, nous signalons quelques réactions par formation de complexes organiques trouvés par nous, qui pourraient être intéressants.

L'iodure d'antimoine en milieu chlorhydrique ou sulfurique réagit sur les alcaloïdes pour donner des réactions de précipitation colorées du type Caille et Viel. Si l'antimoine donne avec ces alcaloïdes des réactions, c'est parce qu'ils sont des amines. Aussi avons-nous essayé une série de corps à fonction aminée, ainsi qu'une série de corps à fonctions phénoliques en ortho qui réagissent avec l'antimoine pour des raisons déjà invoquées.

De l'ensemble de nos recherches, il ressort les faits suivants : Les anesthésiques locaux donnent avec l'antimoine

des précipités jaune orangé à jaune pâle assez sensibles. Il serait intéressant d'essayer de les obtenir par la méthode de Caille et Viel (14) à l'état d'iodostibinates d'anesthésiques locaux cristallisés. Mais ceci sort du cadre de notre travail.

L'antimoine trivalent donne une coloration jaune, tandis que l'antimoine pentavalent donne une coloration jaune brun. Pour caractériser, l'antimoine, on peut le traiter selon la technique de Gutzeit et Weibel (39) par le formol qui ne gêne pas la réaction, puis on le soumet à l'action d'un réactif dont la formule est identique, mais où l'antipyrine est remplacée par l'anesthésique local.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

| Anesthésiques locaux                                    | Sb III                             | Sb V                 |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| a. paraamino-<br>benzoïque .....                        | précipité jaune or                 | précipité jaune brun |
| Novocaïne .....                                         | id. jaune or<br>(dense)            | id.                  |
| Orthoforme (aminoxy-<br>benzoate de mé-<br>thyle) ..... | id. jaune                          | id.                  |
| Tutocaïne .....                                         | id. jaune or                       | id.                  |
| Larocaïne .....                                         | id. jaune<br>canari                | id.                  |
| Stovaïne .....                                          | id. jaune or                       | id.                  |
| Pantocaïne .....                                        | id. jaune<br>canari (peu<br>dense) | id.                  |
| Atophan .....                                           | id. jaune                          | id.                  |
| Alypine .....                                           | id. jaune or                       | id.                  |
| Butelline .....                                         | id. jaune<br>orangé                | id.                  |
| DIVERS :                                                |                                    |                      |
| Urée .....                                              | id. jaune pâle<br>(peu dense)      | id.                  |
| Uréthane .....                                          | id. jaune                          | id.                  |

Ces réactions se font en tube à essai, en godet, sur papier filtre ou sur lame porte-objet.

Nous n'avons pas étudié la spécificité de ces réactifs vis-à-vis de l'antimoine. Nous pouvons affirmer cependant que certains anesthésiques locaux, comme la novocaïne, donnent des précipités denses peu solubles dans l'éther qui peuvent servir soit à la recherche de l'antimoine, soit à l'isolement de la novocaïne. La sensibilité de cette réaction est assez grande; cependant en tube à essai on ne décèle pas 50  $\gamma$  d'antimoine pour une dilution limite de 1/50.000.

Nous signalerons une deuxième réaction de l'hématoxyline avec l'antimoine en milieu acétique, chlorhydrique, phosphorique par formation de laque violette. R. DELABY, S. SABETAY et M. JANOT (28), ainsi que M. R. MOFFAT et H. SPIRO (67) avaient signalé l'hématéine comme réactif de l'antimoine, mais nous n'avons trouvé aucun renseignement sur l'hématoxyline. LANGERON (51) signale cependant des laques colorées avec les métaux lourds. L'antimoine essayé a donné les résultats consignés dans ce tableau :

| Tubes à essais                 | 1             | 2            | 3            |
|--------------------------------|---------------|--------------|--------------|
|                                | eau distillée | Sb III       | Sb V         |
| Hématoxyline neutre.....       | col. jaune    | violette     | rouge vineux |
| Sol. Hématoxyline acide .....  | jaune         | violette     | lilas        |
| Hématoxyline saturée d'alun .. | rouge brun    | noir violacé | gris violacé |

La réaction sur papier filtre est moins bonne, l'hématoxyline colore le papier et le changement de couleur est peu visible. Sur lame porte-objet la réaction est sensible, lorsqu'on utilise le microscope. La réaction en godet permet de déceler de petites quantités d'antimoine. Nous avons trouvé pour l'hématoxyline :

P. L. : = 2  $\gamma$  de Sb métalloïdique

D. L. : = 1/50.000

P. L. : = perception limite.

D. L. : = Dilution limite.

L'hématoxyline donne avec les autres métaux des laques de colorations différentes.

Nous replaçons ici les résultats obtenus précédemment avec les fluorones. Les fluorones de l'oxyhydroquinone autres que la 9 méthyl 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone donnent avec l'antimoine des précipités rouges. A ce titre on peut utiliser la 9 phényl 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone pour la recherche de ce métalloïde.

Pour avoir une idée générale sur les réactifs de l'antimoine il faudra considérer l'ensemble des méthodes analytiques classiques, des méthodes inorganiques, des méthodes cristallographiques, enfin les méthodes d'analyse par stilli-réactions.

Nous renvoyons le lecteur aux travaux antérieurs. (75), (8), (58), (91), (27) etc.

## 2<sup>o</sup> RÉACTIFS HISTOCHIMIQUES DE L'ANTIMOINE

L'histochimie et ses techniques ont évolué ces dernières années sous l'impulsion de nombreux chercheurs (59) (92).

L'histochimie moderne a pour raison d'être de réaliser des réactions colorées par des moyens strictement chimiques tout en conservant la structure des tissus.

### *Qualités à exiger d'une réaction histochimique.*

Les méthodes et les techniques reposent entièrement sur la possibilité de transformer par une réaction chimique un élément ou un composé de cet élément en un composé chimique différent et caractéristique restant en place dans les cellules dont la structure doit être respectée. Que la réaction aboutisse à la formation de cristaux, de précipités colorés ou d'une coloration caractéristique, la connaissance exacte de la réaction ou des composés obtenus n'est pas toujours nécessaire, ce qui compte au point de vue de la recherche chimique, c'est la facilité et la certitude avec laquelle on

perçoit la réaction. Cette perceptibilité dépend de la sensibilité du réactif, celle-ci est d'autant plus grande que le réactif permet de déceler les plus petites quantités du composé étudié. Cette qualité se traduit par des chiffres : la

« perceptibilité limite » exprimée en  $\gamma \left( \frac{1}{1.000.000} \text{ de gramme} \right)$ ,

suivie d'une indication ; la concentration ou « dilution limite », cette dernière est imposée par la cellule. Il faut en outre que la réaction soit spécifique ou du moins sélective, c'est-à-dire qu'elle décèle l'ion cherché avec certitude et qu'elle ne donne pas la même réaction avec d'autres ions. Cette qualité est très difficile à obtenir, aussi s'arrange-t-on en améliorant les conditions d'expériences de façon que la réaction devienne soit spéciale, soit très sélective.

Il faut en outre que le réactif respecte la topographie des cellules ; pour cela on aura avantage à utiliser les réactifs organiques peu nocifs ou des réactifs déjà employés en histochimie. Il faut qu'ils soient assez solubles dans un solvant de préférence neutre, sans être obligé d'ajouter des quantités notables d'acide ou de base pour les dissoudre, ce qui peut détériorer les tissus.

Les solvants doivent être des solvants histologiques comme l'eau, l'alcool ou de préférence des substances apolaires qui amènent très vite le réactif au sein de la cellule vers le médicament ou le produit cherché.

Nous insistons sur ces détails très importants, car si en stilliréaction on peut augmenter la sensibilité et la spécificité de la réaction par l'emploi du papier filtre, milieu cellulosique constitué par des réseaux du capillaires à grand pouvoir absorbant, ce papier filtre est capable, soit de séparer les corps dissous dans le solvant par adsorption ou par diffusion, soit de concentrer la solution à analyser ou le produit résultant de la réaction. En histochimie cette possibilité n'est plus permise : le lieu de la réaction est imposé, elle se passe au sein de coupes histologiques minces de 1 à 20  $\mu$  et formé d'une ou plusieurs couches de cellules isolées

les unes des autres par des membranes ectoplasmiques de nature lipéidique. Ces membranes enveloppent le cytoplasme lipoprotéidique à l'état colloïdal. Ici il ne s'agit plus d'un contact direct entre le réactif et le produit cherché, concentré au préalable par une séparation capillaire ou par diminution de tension superficielle, mais d'un produit se trouvant déjà dans la cellule. Il faut pour amener le réactif jusqu'à lui traverser les barrières lipidiques, cheminer à travers une substance colloïdale avant que le produit cherché n'en soit sorti. La précipitation dans ce milieu colloïdal vivant ou fixé doit se former sans déplacement de substance sous forme d'anneaux de Liesegang (zone de précipitation périodique autour d'un point dû à la diffusion) et surtout que le précipité formé soit fin, limité et coloré fortement. La couleur doit être foncée (rouge, noir, violet, bleu foncé par exemple) afin de donner une lecture plus facile.

#### *Etude critique de ces réactifs.*

Dans le cas particulier de la localisation de l'antimoine, médicament étranger au métabolisme normal, il semble qu'on peut employer des réactifs de spécificité moins marquée, à condition d'opérer sur des coupes témoins. Aussi ne rejetterons-nous pas tous les réactifs non spécifiques de l'antimoine.

Nous avons retenu un certain nombre de réactifs de l'antimoine qui nous paraissent les plus adaptés aux méthodes histologiques. Certains d'entre eux ont déjà été utilisés pour localiser des métaux ou des métalloïdes du même groupe que l'antimoine.

Ces réactifs sont :

L'hydrogène sulfuré.

L'acide phosphomolybdique.

Le réactif de Caille et Viel.

Le réactif à la novocaïne.

Le réactif à la brucine, quinine, etc.

L'alizarine sulfonate de sodium.

La benzidine.

L'oxyquinoléine et sulfates d'oxyquinoléine.

L'hématoxyline en milieu acide.

Les fluorones.

*L'hydrogène sulfuré* a été préconisé depuis longtemps par différents histochimistes pour la détection des métaux :

Fer : QUINCK en 1868.

Plomb : IWAHASHI, 1927 (43).

OKKELS, 1929 (72).

ALMKWIST, CHRISTELLER (1), (21).

SIMONET, 1930 (85).

Arsenic : JUSTUS, 1905 (44).

BRUNAUER, 1921 (13).

EARL O. OSBORN, 1925 (32).

MEMMESHEIMER, 1928 (61).

P. CASTEL, 1935.

Bismuth : DUBINSKY, 1870 (29).

AZOULAY, 1922 (4).

MILLIAN et PERRIN, 1922 (64).

PINKUS, 1924 (77).

P. CASTEL, 1935 (18).

La méthode de ces auteurs repose sur l'action de  $\text{SH}_2$  sur ces métaux. D'après P. CASTEL, la réaction peut se faire selon deux modes opératoires.

Premier mode : On fixe au formol, on coupe à la congélation, on fait réagir ensuite  $\text{SH}_2$  gazeux sur les coupes placées en milieu aqueux acidulé par  $\text{ClH}$ .

Deuxième mode : On fait une inclusion à la paraffine, les coupes collées sont traitées par une solution saturée de  $\text{SH}_2$  dans un solvant convenable (eau, alcool-chloroforme).

Nous avons essayé sous la direction de notre Maître P. CASTEL ces deux méthodes pour détecter l'antimoine. Les résultats obtenus sont peu nets. Nous avons préconisé la fixation avec réaction concomitante par le réactif alcool-

chloroforme ou alcool-acétone saturé de  $\text{SH}_2$  légèrement acidulé. Les résultats après des essais nombreux et variés sont peu satisfaisants; aussi avons-nous renoncé à ce réactif d'usage peu agréable.

*L'acide phosphomolybdique.* — Cette réaction proposée par F. FEIGL et F. NEUBER en 1935 (35) repose sur le fait que, par léger chauffage, l'acide phosphomolybdique est réduit par l'antimoine en bleu de molybdène. Cette réaction, d'après Mlle LIÉVIN, peut être employée en tube à essai et sur papier filtre où elle est assez sensible sans être spécifique. Nous l'avons essayée pour la recherche de l'antimoine en adoptant la technique suivante : Les coupes à la congélation provenant d'animaux injectés et fixés aux vapeurs de formol sont placées dans une solution saturée d'acide phosphomolybdique porté aux environs de  $30^\circ$  ; après un séjour assez long nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants. La solution du réactif primitivement jaune devient verte, puis bleue. Les coupes elles-mêmes présentent une coloration bleu vert uniforme. L'antimoine a quitté les coupes et est passé dans la solution. Ce réactif, dans son état actuel, ne peut servir à déceler l'antimoine sur les coupes.

*Antipyrine.* — Ce composé, employé pour la recherche de l'antimoine dans les liquides biologiques et les urines par CAILLE et VIEL, donne avec l'antimoine un précipité jaune or sensible. Cette sensibilité est variable avec le  $\text{pH}$  d'après Mlle LIÉVIN. Nous l'avons essayé sur des coupes histologiques selon la méthode précédente. Les résultats sont peu intéressants. Le précipité formé étant assez soluble dans l'eau et l'alcool, on ne peut localiser facilement l'antimoine. Si même on arrivait à empêcher le précipité de se solubiliser, la coloration jaune du complexe antimonié ne pourrait être distinguée avec certitude car elle peut être facilement confondue avec le reste de la préparation.

*Quinine, sulfate de quinine, brucine et autres alcaloïdes.* — Ces substances ont été essayées en présence d'iodure de

potassium. Les alcaloïdes et leurs sels employés avec succès pour le bismuth à cause de la coloration rouge du précipité ne peuvent pas être employés pour détecter l'antimoine, car le produit obtenu est jaune. Nous les écarterons pour cette raison.

*L'oxyquinoléine, sulfate d'oxyquinoléine et quinoléine.* — Ces produits signalés par KORENMANN 1930 (49) et dans Jahresbericht der Pharmazie 1937 pour la recherche du bismuth et, plus près de nous, par SAZERAC et POUZERGUE qui ont localisé le bismuth dans les phagocytes du liquide péritonéal sous forme cristalline ont été appliqués par nous à la recherche de l'antimoine. Ils se sont révélés moins spécifiques, les précipités cristallins peu colorés et caractéristiques « in vitro » ne peuvent être appréciés au microscope.

*La benzidine.* — Signalée par B. TOUGARINOFF (91), la benzidine donne avec l'antimoine en présence d'iodure de potassium un précipité cristallin orangé. Nous avons préparé un fixateur alcoolique contenant une faible quantité de benzidine en présence d'iodure de potassium et acidulé légèrement par ClH. Les pièces fixées pendant un à deux jours, après inclusion n'ont pas donné de résultats convenables. L'antimoine passe dans le fixateur.

*L'alizarine monosulfonate de sodium.* — FR. GERMUTH et Cl. MITCHELLS (38) ont signalé la laque donnée par ce réactif avec l'antimoine. On a un précipité rouge foncé. Ce réactif trop général pour être intéressant d'après BLANCPAIN (8) a été employé en histochimie pour détecter le calcaire.

Nous l'avons essayé pour localiser l'antimoine en faisant une solution à 0 gr. 50 % de réactif dans de l'alcool absolu, légèrement acidulé par  $\text{SO}_4\text{H}_2$ . La fixation-précipitation par ce réactif n'a pas donné de résultats.

*L'hématoxyline.* — L'hématoxyline employée de longue date pour déceler : le calcium (RÖHL, LEUTERT, CRETIN etc., d'après LISON (59)), le fer (MAC CALLUM et DIETERLE)

avec lequel il donne une laque bleu noir; le *cuivre* (MALLORY et PARKER) qui donne une laque bleu foncé.

Nous avons essayé l'hématoxyline avec l'antimoine. En milieu acétique ou en milieu phosphorique elle donne une laque violette décelant 2  $\gamma$  d'antimoine métalloïdique pour une dilution limite de 1 : 50.000.

Les pièces fixées aux vapeurs de formol, après coupes à la congélation sont placées dans une solution d'hématoxyline, pas trop fraîche ni trop vieille, à laquelle on ajoute de l'acide acétique ou phosphorique dans la proportion de 2 à 3%; on laisse séjourner ces coupes pendant 10 à 15 minutes. L'antimoine donne une laque violette et le reste de la coupe reste incolore. On lave, et, après avoir coloré légèrement les noyaux par la safranine, on monte en glycérine ou en sirop d'Apathy, car le baume décolore en partie cette laque. La présence d'antimoine peut être facilement contrôlée : On déparaffine des coupes de témoin normal, après les avoir séchées on dépose de l'antimoine sur ces coupes avec un tube capillaire en verre de très fin diamètre de façon à obtenir des gouttes aussi fines que possible. Après séchage on traite ces coupes par quelques gouttes d'hématoxyline phosphorique ou acétique. Les dépôts d'antimoine sont colorés en violet et la coupe ne présente pas de coloration nucléaire, elle a une teinte légère jaune ou grisâtre.

*Les fluorones.* — Les fluorones comme la 9 méthyl trihydroxy fluorone et la 9 phényl trihydroxy fluorone sont des réactifs très sélectifs de l'antimoine. Aussi retiendront-elles notre attention. Nous les avons essayées toutes, mais des deux plus intéressantes la 9 phényl 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone semble donner les meilleurs résultats.

Les réactifs sont en solution alcoolique légèrement acidulés par quelques gouttes de  $\text{ClH}$  ou de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  de façon à obtenir un  $\text{pH} = 4$ . Ces derniers appliqués sur des pièces fixées aux vapeurs de formol ont donné quelques résultats confirmant les résultats partiels obtenus par la technique

ordinaire. Nous les avons employés principalement dans la localisation de l'antimoine et nous préférons, pour les raisons que nous expliquerons plus loin, employer un véhicule plus pénétrant que l'alcool afin de précipiter l'antimoine aux environs de pH 4 au sein de la cellule.

L'antimoine donne avec les fluorones dans les cellules des granules rouges, ces derniers ayant parfois un aspect cristallisé.

### III. — Localisation histochimique des médicaments antimoniés injectés dans l'organisme

#### 1<sup>o</sup> GÉNÉRALITÉS.

La localisation de l'antimoine a intéressé de nombreux chercheurs. L'affaire Pritchard a montré que la dissémination du poison dans l'organisme fournissait plus de renseignements que les lésions observées.

Les toxicologues, les premiers, ont cherché à localiser l'antimoine après destruction des organes et ils ont dosé cet élément par des méthodes d'analyse globale.

D'après HUGOUNENCQ (42) l'antimoine se retrouve principalement dans le foie. OGIER et KOHN-ABREST (71) le localisent dans cet organe (5 à 8 mg par 10 g d'organe), la rate, les reins et, en petites quantités, dans le poumon, le cœur, les muscles. Ils en décèlent enfin à l'état de traces, et après un assez long temps, dans le système nerveux central. CIECHANOWSKI (24) montre que l'antimoine après intoxication aiguë se retrouve dans le tube digestif, et aussi, mais en quantité moindre, dans le foie et les reins. MILLON et LAVERAN (65), en faisant ingérer à l'animal des doses d'antimoine pendant dix jours, après lesquels ils le remettent au régime ordinaire, signalent que pendant les premiers jours la quantité d'antimoine est considérable dans le foie qui augmente de volume. Cet élément se retrouverait également dans le foie des petits d'une Chienne ayant subi le traitement avant de mettre bas. Ces auteurs ajoutent que l'anti-

moine se retrouve dans le cœur, le muscle, les « membranes intestinales » et les poumons. Il n'y en a pas dans le cerveau, les os, la graisse. Après 25 jours l'antimoine pénétrerait dans les organes essentiels, dans le cerveau, le tissu adipeux, puis dans les os. L'effet de l'antimoine s'efface, mais le poison persiste encore plus de 4 mois. POUCHET (80) donne à des Lapins des rations d'émétique (54 mg et 126 mg) et note la présence d'antimoine en proportion notable dans le tube digestif. La peau et les poils, dit-il, en contiennent des traces (anneaux à peine visibles). Il n'y en a pas dans les autres organes. Chez des Lapins intoxiqués par 80 rations de 5 mg, 25 rations de 10, 24 rations de 50 mg, 18 rations de 100 mg soit 3 g 650 d'émétique correspondant à 1 g, 314 d'antimoine métalloïdique, l'auteur signale la présence d'antimoine en quantité notable dans le tube digestif; dans les os plats il y aurait un anneau faible, tandis qu'il ne trouve qu'un anneau plus faible encore dans les os longs, dans les reins, le foie, la peau, les poils et les muscles; des résultats douteux dans le cœur, dans les poumons, dans le sang; des résultats négatifs dans le cerveau.

Chez les Chiens, la localisation est la même, il n'y a pas d'antimoine dans le cerveau, la moelle, dans les muscles, le foie. La quantité de cet élément est plus considérable dans la peau et les poils, et on en trouve une forte proportion dans le tube digestif.

Plus récemment COULLAUD (26) signale que dans l'intoxication aiguë *per os*, on retrouve l'antimoine en grande proportion dans le foie, puis dans les reins, dans l'estomac, dans l'intestin, dans les urines, dans les fèces. Rien dans le poumon ou parfois des traces, rien dans la peau et les poils, des traces non dosables dans la rate, enfin des traces douteuses dans le cerveau.

Dans l'intoxication chronique *per os*, on retrouve le métalloïde dans le foie, les reins, l'estomac, l'intestin, dans l'utérus et les annexes fœtales, des traces dans le poumon, dans le cerveau, la rate, rien dans le cœur, la peau et les poils.

Ces résultats, parmi tant d'autres, montrent entre eux des discordances, notamment pour le foie où **POUCHET** n'est pas d'accord avec les autres toxicologues. Pour la peau et les poils, **COULLAUD** ne trouve rien, alors que **POUCHET** trouve des traces importantes d'antimoine chez le Chien et un peu moins chez le Cobaye.

Dans le cœur, **MILLON** et **LAVERAN** (65) en retrouvent des quantités notables dans les premiers jours de l'intoxication, alors que les autres toxicologues n'en trouvent pas (**COULLAUD**), ou parviennent à des résultats douteux (**POUCHET**).

Ces divergences dans les résultats montrent que les méthodes utilisées ne donnent pas toujours des localisations précises. Les doses absorbées, les temps d'intoxication sont variables. Il n'est donc pas étonnant que ces localisations globales ne donnent que des résultats qui n'apportent que des renseignements incomplets pour la connaissance des localisations précises de substances d'origine exogène et pour la détermination des mécanismes biochimiques qui se déroulent dans le tissu vivant (16).

Ces dernières années, en raison des progrès de la chimie, la thérapeutique antimoniale connaît une vogue de plus en plus croissante et il est intéressant de connaître le sort de ces médicaments injectés par petites doses dans l'organisme; l'importance de leur localisations a été comprise par certains histologistes.

En effet, **POLICARD** et ses collaborateurs (77<sub>1</sub>) (77<sub>2</sub>) (77<sub>4</sub>) (78) ont fait avancer la question en établissant une méthode histospectrographique qui constitue un excellent mode de détection des métaux dans le tissu : On prélève un fragment frais ou fixé de l'organe étudié et on fait jaillir une étincelle en un point donné. L'examen du spectrogramme obtenu sur une plaque photographique permet de déterminer les corps simples contenus dans l'échantillon examiné, à condition que ces corps ne soient pas présents, même à l'état de traces, dans les électrodes utilisées. Ces auteurs ont même pensé à tirer de cette méthode une évaluation approximative de la

quantité de certains éléments contenus en très faible proportion dans les tissus, évaluation très imprécise au regard du physicien, mais d'un grand intérêt cependant pour l'histo-physiologie ou l'anatomie pathologique. Tout récemment, GAILLARD a établi, dans le cas particulier des traces de cuivre contenues dans les tissus, une méthode de microdosage par étincelage des coupes et détruisant très peu de substance (environ  $0,1 \text{ mm}^3$ ). Cette méthode est d'une grande sensibilité, mais la localisation topographique est limitée en précision, le territoire détruit par l'étincelle ne correspondant pas toujours strictement à une cellule déterminée mais à un groupe de cellules. En ce qui concerne l'antimoine, POLICARD et BOUCOMONT (78) en 1933 déjà, ont tenté de jeter un jour nouveau sur la question en employant la méthode histospectrographique, qui permet une localisation chimique d'une grande sensibilité grâce à la présence de certaines raies caractéristiques d'antimoine. Cependant la localisation topographique est imparfaite, car le territoire détruit (sur des coupes minces de 5 à  $20 \mu$  fixées au formol et étalées sur une plaque de substance conductrice) ne correspond pas, à la cellule visée, si fine que soit l'électrode en or, et si parfait que soit le système générateur d'étincelle. Ces auteurs ont essayé de localiser cet élément chez une fillette décédée à la suite de maladie malgré un traitement au stybial et au néostibosan. Les résultats de ces auteurs sont très prudents, ils signalent la présence d'antimoine dans le parenchyme pulmonaire et en divers points du poumon. L'antimoine ne se retrouverait dans la rate que très exceptionnellement et en quantité réduite. On le trouve aussi dans le tissu hépatique, mais pas dans le sang des vaisseaux ni dans la paroi des artères pulmonaires, ainsi que dans les parois des bronches.

Des recherches histochimiques plus précises en vue de la localisation de l'antimoine sont appelées à rendre de nombreux services. Elles n'ont pas à notre connaissance été entreprises. Comme notre Maître, P. CASTEL, avait déjà localisé histochimiquement des toxiques comme l'arsenic et

le bismuth, il nous a paru intéressant de faire l'étude des localisations de l'antimoine et nous avons cherché avec lui à établir une technique capable de localiser le médicament à coup sûr au sein de la cellule (17).

## 2<sup>o</sup> ÉTABLISSEMENT DE LA TECHNIQUE.

Si pour l'arsenic et le bismuth qui sont voisins de l'antimoine, les résultats sont obtenus aisément avec l'hydrogène sulfuré, les sels de cuivre, l'iodure de potassium, les chromates alcalins et les alcaloïdes tels que la quinine, la cinchonine, la brucine etc., pour l'antimoine les résultats ne sont pas aussi nets. La coloration jaune donnée par l'antimoine avec la plupart des réactifs rend leur application plus difficile. Les réactifs cristallographiques ne peuvent être employés comme nous l'avons déjà indiqué. La rhodamine B signalée pour déceler l'antimoine pentavalent ne peut être utilisée car dans l'organisme l'antimoine pentavalent passe à l'état d'antimoine trivalent. Si on traite la coupe par une solution de nitrite, il est à craindre que l'antimoine, qui traverse très rapidement les cellules, ne soit pas localisé *in situ*. Nous emploierons donc l'hématoxyline acide et les fluorones que nous avons déjà choisies dans notre étude critique des réactifs histochimiques.

Les animaux et les médicaments employés sont les mêmes que lors de l'étude de l'action des médicaments antimoniés. Une partie des organes a été fixée au formol ou au liquide de Bouin, l'autre partie est réservée à la localisation de l'antimoine. Cette localisation présente de sérieuses difficultés : en premier lieu, il faut empêcher la diffusion du médicament, puis trouver un véhicule pénétrant capable d'amener le réactif jusqu'à ce dernier à travers la cellule, avant qu'il n'en soit sorti.

L'antimoine pénètre vite dans l'économie d'où il s'élimine très rapidement (54). L'émétique appliqué en pommade au pli du coude se retrouve une demi-heure après dans les urines. L'extraordinaire vitesse de diffusion de ce

médicament à travers les cellules peut expliquer son issue facile des tissus ou des organes lorsqu'on les met dans un liquide fixateur alcoolique ou aqueux. Après les délais prévus pour la fixation on ne le retrouve plus, il est passé presque en totalité dans le fixateur qui présente lui-même les réactions de l'antimoine sous l'action du réactif. En essayant de raccourcir le temps de fixation par une technique rapide fréquemment employée en anatomie pathologique, c'est-à-dire fixation à chaud par du formol à 20 % pendant 15 minutes, on n'arrive pas à empêcher la diffusion. Par contre, dans les cas où l'on peut éviter la fixation par un liquide comme dans les cas du liquide péritonéal ou des poils tombés d'une plaque d'ecthyma stibiæ, par action d'une solution alcoolique de fluorone sur des préparations fixées par la chaleur on retrouve l'antimoine sous forme de granulations rouges. Ces premiers résultats nous montrent que l'antimoine n'est pas masqué, mais perdu au cours de la fixation, même par l'alcool absolu dans lequel l'émétique est insoluble. Il semblerait que dans l'organisme l'antimoine donne un complexe cellulaire soluble dans l'alcool. Nous avons préconisé alors la fixation par les vapeurs de liquides fixateurs. Les vapeurs d'acide osmique en solution à 1 ou 2 pour cent, d'après la technique préconisée par VIALLETON (98), noircissent les pièces et gênent la localisation. Aussi les avons-nous écartées au profit de la fixation par les vapeurs de formol. Cette technique fut préconisée par BOURNE (10), auteur australien, lors de la recherche et de la localisation de l'acide ascorbique. Nous utilisons une solution de formol à 40 % placée dans un récipient à large goulot bouchant à l'émeri. On garnit le tiers inférieur de billes de verre pour favoriser l'émission de vapeurs. On recouvre d'une couche de coton hydrophile et le tout est garni d'une couche de gaze. Les pièces sont fixées pendant 24 à 48 heures et plus, aux environs de 30°. Après ce laps de temps, on peut conserver encore un certain temps les pièces dans un flacon bouché, sur un lit de gaze imprégnée de formol à 10 %.

La deuxième difficulté est de trouver un véhicule pénétrant capable de solubiliser le réactif et de l'amener très vite à l'intérieur des cellules. L'eau et l'alcool employés très fréquemment pénètrent à l'intérieur des tissus, mais assez mal. Il y aurait plutôt extraction des substances tissulaires que pénétration de ces liquides dans la cellule. Les solutions de Bouin-fluorone et de formol-fluorone, alcool-fluorone n'ont pas donné de réaction *in situ*. Il se forme une coque autour des pièces qui empêchent les fluorones grosses molécules organiques de pénétrer; si bien que l'antimoine passe dans le véhicule et donne un abondant précipité rouge. Il faut renverser le sens de la perméabilité cellulaire. Les cytoplasmes cellulaires sont des hydrogels dont les constituants forment un complexe lipide-protide-eau en équilibre, appelé cénapse (MACHEBŒUF, MEITÈS); la membrane ectoplasmique qui entoure le cytoplasme des cellules serait très riche en lipides et jouerait un rôle capital dans la perméabilité cellulaire. L'eau peut passer à travers cette membrane par suite des variations d'hydrophobie des couches de lipides, de protide et d'eau, formant un système stratifié. A travers cette barrière lipidique, on conçoit, que les substances apolaires et les ions hydrophobes passent plus facilement. A la lumière de ces données, on voit l'intérêt des recherches d'OVERTON sur la perméabilité cellulaire (73) ainsi que des travaux de COLLANDER et BARLUND (25) (1934), HÖFLER (41) (1934), qui établissent l'extraordinaire vitesse de pénétration des hydrocarbures et des substances apolaires, qui sont caractérisées par leur hydrophobie. Ces substances sont par exemple le benzène, le chloroforme, l'éther etc. Ces derniers employés seuls, d'après les travaux de MACHEBŒUF (60), n'extraient pas les lipides, il faut des traces d'alcool éthylique, d'acétone ou de saponosides pour que l'extraction ait lieu (TAYAU) (88). Il était intéressant pour nous d'employer des liquides pénétrants comme le benzène, le chloroforme ou de substances apolaires qui dissolvent les lipides et permettent le passage. Mais ces dernières sont

toxiques pour les cellules vivantes et ne dissolvent pas les fluorones. Leur dissolution exige la présence dans le solvant d'un certain nombre de groupements polaires. Nous avons cherché un compromis entre ces deux exigences extrêmes en choisissant l'alcool amylique préconisé par MERTÈS (communication orale) où le groupement alcoolique se trouve alourdi par des groupements à tendance hydrophobe que nous exaltons par la présence de carbures. Après bien des tâtonnements nous sommes arrivé à obtenir un mélange homogène de substances apolaires douées d'une grande vitesse de pénétration et qui solubilisent nettement les fluorones ainsi que l'hématoxyline tout en étant relativement moins toxiques. Le véhicule est préparé selon la formule suivante :

|                        |                    |
|------------------------|--------------------|
| Benzène .....          | 10 cm <sup>3</sup> |
| Chloroforme.....       | 10 cm <sup>3</sup> |
| Alcool amylique .....  | 30 cm <sup>3</sup> |
| Alcool éthylique ..... | X gouttes          |

A ce véhicule on ajoute une quantité de 9 phényl, 2, 3, 7, trihydroxy, 6 fluorone suffisante pour le saturer. On acidifie par l'acide chlorhydrique D = 1,19 à raison de XV gouttes environ pour 100 cm<sup>3</sup> de solution.

Le liquide obtenu est de couleur brun rouge. Il pénètre vite dans les cellules et permet une localisation correcte de l'antimoine au sein des cellules.

Nos techniques découleront des moyens apportés pour résoudre ces difficultés; nous avons institué deux techniques :

#### 1<sup>o</sup> *Technique rapide.*

Les pièces prélevées sont fixées aux vapeurs de formol pendant 24 à 48 heures et plus, selon leur épaisseur. Sans laver, car le formol ne gêne pas la réaction, on fait des coupes à la congélation, épaisses de 10 à 15  $\mu$ ; on les place dans le réactif alcoolique de fluorone ou bien dans le réactif pénétrant apolaire amené au voisinage de pH 4 et contenant soit la fluorone, soit l'hématoxyline. Après 15 minutes on

lave à l'alcool; après une coloration nucléaire appropriée on monte au baume. Parfois on a avantage à monter sans coloration. Avec l'hématoxyline on monte au sirop d'Apathy ou à la glycérine, car le baume fait disparaître rapidement, en partie, la coloration du complexe. Cette méthode rapide donne de bons résultats approximatifs. Pour les localisations cytologiques nous préférons employer une deuxième technique.

## *2<sup>o</sup> Technique à la paraffine.*

Les pièces d'organes frais sont découpées en tranches minces de 5 mm au maximum et placées dans le réactif pénétrant, à la température de 40°, pendant 6 heures. On complète la fixation amorcée par l'alcool amylique par un fixateur histologique comme le liquide de Bouin par exemple. Après lavage à l'alcool on inclut à la paraffine selon les techniques ordinaires.

On peut encore opérer de la façon suivante :

Les pièces minces peuvent être fixées préalablement aux vapeurs de formol, puis on les place dans le réactif pénétrant dans les mêmes conditions. Après 6 heures, la précipitation est terminée; on lave à l'alcool et on inclut à la paraffine. Cette deuxième technique, sur des pièces fixées par le formol, peut être l'objet de critiques. On peut la justifier comme l'a fait M. MERRÈS (62) (63). L'action fixatrice du formol bloque les fonctions aminées des protéïdes sans toucher aux lipides du complexe cytoplasmique qui règlent seuls la perméabilité cellulaire. Les bons résultats obtenus permettent de préconiser cette technique.

Le liquide de Bouin et le formol, dans nos deux techniques, ne gênent pas la précipitation de l'antimoine. Les complexes obtenus résistent assez bien aux traitements des techniques histologiques. Signalons que les pièces avant de subir l'action du réactif pénétrant doivent être rapidement imbibées d'alcool pour ne pas précipiter les fluorones.

### 3<sup>e</sup> RÉSULTATS DE NOS OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES

De très nombreux auteurs ont attribué au système réticulo-endothélial une place importante en physiologie normale et pathologique, ainsi qu'en immunologie. Il nous a paru intéressant, dans le cadre de nos recherches sur la localisation de l'antimoine, de nous rendre compte du rôle de ce système.

Nous avons étudié divers organes éliminateurs comme le rein, la peau et certaines glandes excrétrices, où il était logique de supposer aussi une localisation possible de l'antimoine. Nous l'avons recherché également dans les tissus à vie plus ralentie comme les os et le tissu adipeux, ainsi que dans le système nerveux central. Nos résultats ont montré que l'antimoine se trouve localisé dans un certain nombre d'entre eux.

**LA RATE.** — Chez l'Homme la rate constitue l'élément principal du système réticulo-endothélial. Il est évident que les propriétés physiologiques de cet organe important résument en quelque sorte celles du système réticulo-endothélial tout entier. La rate, douée d'un pouvoir phagocytaire considérable, constitue un organe érythrolytique phagocytant les globules rouges vieillissants, les globules blancs altérés, les plaquettes sanguines. Elle doit être considérée comme le principal dépôt de fer provenant de la destruction des globules rouges retenus au niveau des cordons de Billroth et dans la gaine des capillaires de ces cordons. Les pigments ferrugineux y sont nombreux et peuvent être décelés par la réaction de PERLS et VOGEL (76). Nous avons appliqué aux fragments de rate successivement les deux techniques. Les résultats sont à peu près identiques. L'antimoine donne une coloration rouge avec les fluorones, violette avec l'hématoxyline acide. Le fer ne gêne pas la réaction car il est masqué.

Dans l'intoxication aiguë par les médicaments antimoniés, l'élément se retrouve en quantité importante dans la pulpe rouge, fixé sur le pigment ocre qu'il entoure comme d'une coque. Il se fait un dépôt rapide de l'antimoine sur ces pig-

ments, avec flocculation nette autour des phagocytes. Dans le traitement par injection médicamenteuse de longue durée, on retrouve peu d'antimoine dans la rate. Il semble qu'il y passe sans se fixer; s'il se fixe, c'est sous forme de quelques rares granules à l'intérieur des éléments du système réticulo-endothélial. On le retrouve en petites quantités dans l'endothélium des sinus veineux.

Dans les deux cas, on n'observe jamais d'antimoine dans la pulpe blanche.

LE FOIE. — Dans les capillaires radiés à paroi endothéliale d'une extrême minceur, l'antimoine se trouve localisé au niveau des cellules de Kupffer. Il y est nettement floclé et athrocyté. Dans l'intoxication aiguë, on le trouve fixé au niveau des espaces-portes et des veines centrolobulaires. Dans le traitement de longue durée, l'antimoine se retrouve aux mêmes endroits, mais en quantité bien moindre. Les cellules hépatiques, dans les deux cas ne renferment pas d'antimoine.

LE POUMON. — Le poumon possède des alvéoles pulmonaires dont l'endothélium de revêtement est formé chez les Mammifères de deux catégories de cellules, les grandes plaques anucléées, et les petites, granuleuses, douées de propriétés athrocytaires qui les rapprochent physiologiquement des éléments du système réticulo-endothélial. C'est à leur niveau qu'il était intéressant de rechercher l'antimoine. Il y est à l'état diffus comme dans le parenchyme pulmonaire.

LES REINS. — De par ses fonctions d'excrétion, le rein intussuscepte de nombreux sels métalliques. L'antimoine y est localisé dans les tubes contournés. Il se trouve au centre de la cellule à l'état de fines granulations et enfin il est assez abondant dans la zone des bordures en brosse. Les glomérules et leur capsule ne présentent pas de traces d'antimoine.

LES PHAGOCYTES DU LIQUIDE PÉRITONÉAL. — Le liquide péritonéal est très riche en phagocytes actifs. Chez les Co-

bayes traités pendant quelque temps par l'antimoine nous avons pu le déceler dans ces éléments. Sur une lame bien dégraissée, on étale une goutte de liquide péritonéal retiré par ponction ou après avoir sacrifié l'animal. La préparation séchée est fixée à la chaleur. Après traitement par le réactif à la fluorone, la préparation montre quelques phagocytes chargées de granulations rouges. Les uns sont adsorbés à la surface, les autres sont intra-cellulaires.

LA PEAU. — La peau est le siège d'une élimination importante de l'antimoine par formation de pustules d'« *ecthyma stibiæ* » signalées par divers toxicologues. A ce niveau, l'antimoine est localisé dans le stratum granulosum et dans le stratum spinosum. La distribution de cet élément en ces points est irrégulière. La couche basilaire ne présente pas beaucoup de granulations d'antimoine.

LES POILS. — Les poils des animaux traités ne portent pas de dépôts d'antimoine, ce n'est qu'au voisinage des plaques d'ecthyma stibiæ qu'on en trouve. Le tégument s'élimine par grande desquamation en cet endroit. Autour du point lésé les poils tombent par petites touffes reliées ensemble à leur base par une gangue d'exsudat. Si on étale une de ces touffes sur une lame porte-objet après traitement par le réactif pénétrant, on constate que l'antimoine se trouve dans la gangue formée par l'exsudat en couches superposées traduisant les éliminations successives. Les poils eux-mêmes ont un bulbe coloré. L'antimoine se trouve tout au début, probablement dans la couche de Henle.

LE TISSU CONJONCTIF. — Au niveau de l'ecthyma stibiæ, il se forme, autour de la lésion, une coque fibreuse qui doit la circonscrire. En cet endroit, nous avons trouvé une localisation de l'antimoine dans le tissu conjonctif sous-cutané. Il s'y trouve fortement fixé au niveau des fibroblastes. Ces derniers ont leur cytoplasme farci de granulations rouges à côté d'un noyau pycnotique.

LES MUSCLES STRIÉS. — Toujours au niveau de l'ecthyma stibiæ, mais dans la région des muscles sous-cutanés, la localisation de l'antimoine est intéressante à connaître également. On en trouve au niveau du sarcoplasme sous forme de grains en chaînettes qui délimitent très nettement les myofibrilles, comme nous avons pu le déterminer par comparaison avec des coupes à l'hématoxyline au fer bien différenciées.

L'ESTOMAC. — Bien que les Cobayes n'aient pas reçu d'antimoine par voie buccale, nous avons trouvé cependant la présence de ce métalloïde au niveau de l'estomac. Il y est, il est vrai, en très petites quantités. Il semble être localisé dans la partie apicale des cellules du collet des glandes fundiques et des cellules du fond des cryptes stomacales. Il est donc probablement éliminé à ce niveau.

L'INTESTIN. — Nous y avons trouvé également l'antimoine en quantité plus réduite encore. Les granulations d'antimoine se trouvent dans l'axe chorial de quelques villosités.

LES GLANDES SALIVAIRES. — Nous avons trouvé de l'antimoine dans ces organes, surtout au niveau des canaux excréteurs et dans de nombreuses cellules glandulaires.

UTÉRUS. — L'antimoine ne provoque pas d'avortement chez l'animal gravidé; on le retrouve dans l'endothélium des vaisseaux de l'utérus, dans le placenta maternel; enfin dans l'épithélium de l'amnios.

LE TISSU ADIPEUX. — Chez les Cobayes traités pendant 32 jours, par des doses moyennes d'émétique, nous avons prélevé des fragments de tissu adipeux, nous n'avons pas retrouvé l'antimoine après ce laps de temps.

LES OS. — Les os, comme le tissu adipeux sont des tissus à vie plus ralentie. Lors du traitement antimonié de longue durée (32 jours) nous avons obtenu des localisations inté-

ressantes. L'antimoine se retrouve dans les os longs et en quantité plus importante dans les os plats. L'antimoine est visible dans les ostéoblastes sous forme de grains rouges. On les voit également dans les canalicules osseux, dont ils dessinent les réseaux; on les retrouve également dans les vaisseaux des canaux de Havers. Cette localisation dans les ostéoblastes nous paraît importante surtout au cours de l'intoxication chronique de longue durée.

LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL. — Chez le Cobaye intoxiqué pendant 32 jours par de l'antimoine, on ne trouve pas de traces nettes au niveau du bulbe et du cervelet. Le cerveau lui-même ne révèle pas de traces localisables.

L'ŒIL. — Chez les animaux intoxiqués pendant 32 jours nous n'avons pas retrouvé d'antimoine dans les organes de la vision.

#### 4<sup>o</sup> DISCUSSION DES RÉSULTATS

*Dans la rate*, nos résultats diffèrent de ceux de POLICARD et BOUCOMONT. Ces derniers ne trouvent que de faibles traces d'antimoine. D'après eux on n'en retrouverait qu'exceptionnellement et en petites quantités. Il est possible que lors de la fixation par le formol, l'antimoine passe dans le fixateur. Il est possible aussi que le sujet ait subi depuis un certain temps le traitement antimonié, dans ce cas les résultats concordent avec ceux que nous avons obtenus après médication de longue durée. Nous sommes d'accord avec KOHN-ABREST et COUILLAUD qui trouvent des traces non dosables d'antimoine dans la rate par la méthode toxicologique. Chez le Cobaye cet organe est de dimensions réduites. La quantité globale d'antimoine est faible; cependant, grâce à notre méthode histochimique sensible, nous avons pu localiser l'antimoine pendant les premiers jours de l'intoxication, la quantité diminue avec le temps pour devenir très faible, même avec un réactif sensible.

*Le Foie*, organe de volume plus considérable, présente, d'après les toxicologues, une teneur assez grande en antimoine. D'après notre méthode histochimique, nous trouvons que la densité des granulations colorées dans le foie est plus faible que dans la rate. Comme la masse du foie est grande, la quantité globale d'antimoine peut paraître grande comme le prouvent les résultats toxicologiques donnés par la plupart des auteurs, à l'exception de POUCHET qui ne trouve qu'un anneau très faible du métalloïde. Sans être aussi affirmatif, nous pensons que la quantité d'antimoine localisée dans cet organe est notable au début de l'intoxication, comme l'ont remarqué MILLON et LAVERAN; mais qu'elle diminue à la longue, ce qui peut expliquer les résultats trouvés par POUCHET qui a intoxiqué les animaux pendant une période très longue correspondant à l'absorption de 3,650 g d'émétique administré par petites fractions.

*Pour le poumon* nos résultats concordent avec ceux des toxicologues notamment POUCHET, COUILLAUD, POLICARD et BOUCOMONT.

*Pour les reins*, nos résultats sont analogues à ceux des toxicologues. Avec POUCHET nous trouvons que la quantité d'antimoine y est faible. Des localisations nettes n'ont été obtenues en quelques points de la coupe qu'avec des doses toxiques.

*Pour le liquide péritonéal* nos résultats sont à peu près analogues à ceux de SAZERAC et POUZERGUE.

*Pour la peau et les poils* les résultats concordent avec ceux des divers toxicologues. Lors de l'intoxication aiguë, la peau saine et les poils ne présentent pas de trace d'antimoine. Dans l'intoxication chronique avec éruption d'«*ecthyma stibiae*», la localisation est importante au niveau de ces vésicules.

Il en est de même dans les *tissus conjonctifs et les muscles striés* sous cutanés de ces mêmes régions. MILLON et LAVERAN avaient signalé la présence d'antimoine dans le muscle.

*Pour l'estomac et l'intestin*, l'antimoine peut provenir de la salive ou du sang circulant. La quantité n'est pas considérable comme dans l'administration per os.

*Pour les glandes salivaires*, la présence d'antimoine sur les coupes confirme les résultats pharmacodynamiques déjà obtenus par nous.

*Les os*, dans l'intoxication chronique après 32 jours de traitement, montrent déjà une localisation de l'antimoine. Dans les os plats, on en trouve une plus grande quantité que dans les os longs. Nos résultats concordent avec ceux de POUCHET. Peut-on confondre l'antimoine avec le calcium? A ce  $\phi$ H, le réactif ne décèle pas le calcium. Dans le cas le plus favorable, on obtient une coloration rose; or ici nous avons trouvé des grains rouges.

*Le tissu adipeux et le système nerveux central* ne présentent pas de traces d'antimoine, localisables après 32 jours. MILLON et LAVERAN avaient signalé que l'antimoine, après 25 jours, passait dans les organes essentiels dans l'ordre suivant : cerveau, tissus adipeux et os. Or, après 32 jours, nous n'avons trouvé l'antimoine que dans les os et pas encore de traces localisables dans les autres organes.

Nos résultats pour *l'utérus et pour le fœtus* confirment le passage du médicament de la mère à l'embryon comme l'avaient signalé MILLON et LAVERAN, ainsi que COUILLAUD. L'antimoine ne provoque pas l'avortement, ni la mort du fœtus même très jeune.

Dans l'ensemble, nos résultats sont en accord avec ceux des toxicologues et des histologistes qui se sont occupés avant nous de la même question; ils apportent cependant en plus, avec une méthode nouvelle de détection, des précisions sur les localisations exactes de l'antimoine dans les tissus et organes.



## CONCLUSIONS

La chimie analytique nous a donné une nouvelle réaction de l'antimoine. Cette réaction obtenue par formation d'un complexe peu soluble et fortement coloré, s'est montrée spécifique et sensible dans la méthode des stilliréactions. Elle a donné de très bons résultats pour la recherche de l'antimoine. Nous avons essayé de transporter cette réaction dans le domaine histochimique.

Ceci nous a amené à étudier les fluorones de l'oxyhydroquinone et à réaliser assez commodément leur préparation.

L'étude analytique de ces fluorones : (la 9 méthyl et la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone) nous a permis de mettre en valeur leurs propriétés vis-à-vis de l'antimoine. Nous avons déterminé la sensibilité et la spécificité de la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone. Nous pensons qu'elle peut servir, comme la 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone de réactif sélectif de l'antimoine à  $pH$  3,5. Enfin la réaction fluorone-antimoine ayant une valeur quantitative, nous a permis d'établir une méthode de dosage pondéral à la fois simple et précise, s'appliquant à de petites quantités d'antimoine.

A côté de ce travail, nous avons pu étudier avec TURCHINI et CASTEL des propriétés particulières des fluorones vis-à-vis des constituants cellulaires, en particulier du noyau. Nous avons avec eux étudié et mis au point une réaction nucléale analogue à celle de Feulgen reposant sur l'action des fluorones vis-à-vis des sucres, permettant de différencier l'acide thymo-nucléique (ribodésose), de l'acide zymo-nucléique (ribose). Nous avons constaté que les fluorones permettent aussi des colorations nucléaires par les laques de fluorones.

Nous avons ensuite appliqué avec CASTEL les fluorones à la localisation histochimique des médicaments antimoniés injectés dans l'organisme. Nous avons ainsi groupé des notions générales sur ces médicaments; nous avons observé leur action, les symptômes qu'ils déterminent, leur élimination, et donné un aperçu histologique de l'action de l'antimoine sur les organes. Après avoir étudié les réactifs de l'antimoine, nous en avons retenu quelques-uns comme réactifs histo-chimiques. Nous les avons utilisés dans une série de techniques nouvelles, fondées sur des considérations rationnelles, qui nous ont permis d'obtenir une localisation correcte et complète des médicaments antimoniés dans l'organisme, problème resté jusqu'ici sans solution.

Nos résultats biologiques ont été confrontés avec les résultats obtenus en toxicologie et en histospectrographie. Loin d'être en contradiction avec ces derniers, ils permettent de mieux les comprendre. Ils ont en outre l'avantage de nous montrer la localisation exacte de l'antimoine dans la cellule, et de nous permettre de mieux préciser l'action du médicament dans l'organisme.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 — ALMQVIST. — in LISON *Histochimie animale. Méthodes et Problèmes*. Gauthier-Villars, édit., Paris, 1938.
- 2 — AUBRY (P.). — Recherche du bismuth dans l'urine. *Journ. de Pharm. et de Chim.*, 7<sup>e</sup> série, t. 25, 15, 1922.
- 3 — AUGIER et FAURE-BRAC. — Recherche sur l'action de l'antimoniouthiomalate de lithium dans la leishmaniose canine. *Rev. path. comparée et d'hyg. générale*. N° 465, juin 1935.
- 4 — AZOULAY. — Stomatite bismuthique. *Presse Médicale*, t. 30, p. 164, 1922.
- 5 — BAUER (H.). — Die feulgensch Nuklealfärbung in ihrer Anwendung auf Cytologische Untersuchungen, in: *Zeitschr. Zellenforschung und Mikrosk. Anat.*, t. 15, p. 225, 1932.
- 6 — BEILENSTEINS. — *Handbuch der Organischen Chemie*. Vierte Auflage, t. 8, n° 737 à 890, pp. 246-247, 1925.
- 7 — BERNARD. — Traitement de la bilharziose vésicale. *Arch. pharm. militaire*, pp. 939-945, juin 1923.
- 8 — BLANCPAIN (C.-P.). — Contribution à l'étude de l'antimoine au moyen de réactif organique et recherche analytique sur la 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone. *Thèse Sc. Genève*, n° 983, 87 p., 1937.
- 9 — BOIVIN (A.). — Les nucléoprotéides et la constitution chimique des microorganismes. *Bull. Soc. chim. biol.*, t. 24, pp. 134-143, 1942.
- 10 — BOURNE (G.). — *Austral. Journ. exper. Biol. a. Méd. Sc.*, t. 11, p. 261, 1933.
- 11 — BRABANT (H.). — Sur la détection histochimique du bismuth et son élimination par les glandes salivaires du Cobaye. *Arch. de biol.*, t. 52, pp. 117-137, 1941.
- 11<sup>1</sup> — BRACHET (J.). — Le rôle physiologique et morphogénétique du noyau. *Actualités scientifiques et industrielles*, n° 698. Hermann et Cie, édit., Paris, 1938.
- 12 — BRAHMACHARI. — Méthode d'examen chimique des viscères pour la détection de Sb. In *Chemiotherapie of antimonial compounds in kala azar infection*, part. III., *Indian Journ. of med. research.*, p. 196, 1924.

- 13 — BRÜNAUER (S.-R.). — Ueber mikrochemische histologische nachgewiesene Arsen bei Hyperkeratosis arsenicalis. *Arch. für Dermat. u. Syph.*, t. 129, p. 186, 1921.
- 14 — CAILLE (E.) et VIEL (E.). — Sur un nouveau réactif des alcaloïdes et la préparation des iodobismuthates de ces corps à l'état cristallisé. *C. R. Ac. Sc.*, t. 176, pp. 1156-1159, 1923.
- 15 — CASSOUTE, GIROUD et TRABUC. — Un nouveau cas de kala azar autochtone de l'adulte. Guérison par le traitement stibié. *Bull. et mém. Soc. méd. hôp. Paris*, t. 48, p. 1070, 1932.
- 16 — CASTEL (P.). — Contribution à l'étude de la localisation histochemique de certaines substances médicamenteuses. I. L'Arsenic. *Arch. de la Soc. des Sc. méd. et biol. de Montpellier et du Languedoc méditerranéen*, t. 14, pp. 430-435, 1935.
- 16<sup>1</sup> — CASTEL (P.). — Contribution à l'étude de la localisation histochemique de certaines substances médicamenteuses. II. Le Bismuth. *Arch. de la Soc. des Sc. méd. et biol. de Montpellier et du Languedoc méditerranéen*, t. 14, pp. 453-456, 1935.
- 16<sup>2</sup> — CASTEL (P.). — Élimination de l'arsenic par les phanères cutanés. *Arch. de la Soc. des Sc. méd. et biol. de Montpellier et du Languedoc méditerranéen*, t. 14, pp. 525-529, 1935.
- 16<sup>3</sup> — CASTEL (P.). — Sur une nouvelle réaction permettant de caractériser le bismuth dans les tissus et organes, *ibid.*, t. 16, pp. 587-589, 1935.
- 16<sup>4</sup> — CASTEL (P.). — Contribution à l'étude histochemique de la localisation de certaines substances médicamenteuses ou toxiques. *Thèse Pharmacien supérieur*, n° 26, 89 p., 1 pl. col., Montpellier, 1935.
- 17 — CASTEL (P.) et KHAU VAN KIEN (L.). — Localisation de l'antimoine dans l'organisme après injection de médicaments antimonisés. *Soc. de Pharmacie de Montpellier*, t. 2, pp. 192-196, 6 fig., 1944.
- 18 — CAUSSE (H.). — Sur l'antimonite acide de pyrocathéchine. *C. R. Ac. Sc.*, t. 114, p. 1072, 1892.
- 19 — CAUSSE (H.) et BAYARD (C.). — Sur les antimonites de pyrogallol. *C. R. Ac. Sc.*, t. 115, p. 507, 1892.
- 20 — CAWSTON (F.-G.). — in SWADJIAN J. *trop. Méd. Hyg.*, t. 32, p. 169, 1935.
- 21 — CHRISTELLER (W.-G.). — Histochemischer Nachweis des Wismuth in den Organen. *Medizinische Klinik*, t. 161, p. 619, 1926.

- 22 — CHRISTIANSEN (W.-G.). — *Organic, derivations of Artimony*, New York, 1935.
- 23 — CLOETTA. — Recherches sur la rétention des préparations de l'antimoine dans le corps et l'accoutumance à celles-ci. *Arch. f. exper. pathol. und pharm.*, t. 64, p. 352, 1911.
- 24 — CIECHANOWSKI. — Répartition de l'antimoine dans les organes. *Ann. hyg.*, 8, t. 40, p. 127, 1898.
- 25 — COLANDER et BARLUND. — in METTÈS (M.). *Bull. Soc. bot. de Fr.*, t. 88, pp. 410-413, 1941.
- 26 — COULLAUD (J.-J.-P.). — Contribution à l'étude toxicologique de l'antimoine. *Thèse Doct. Univ. pharm.*, Bordeaux, n° 273, 116 p., 1937.
- 27 — DELABY (R.) et GAUTIER (J.-A.). — Analyse qualitative minérale à l'aide de stilliréactions. *Masson, édit.*, 1940.
28. — DELABY (R.), SABETAY (S.) et JANOT (M.). — Sur la caractérisation des doubles liaisons par le trichlorure d'antimoine. *C. R. Ac. Sc.*, t. 198, pp. 276-278, 1934.
- 29 — DUBINSKY in MULLER (H.). — Wismuthbehandlung der Syphilis. *Zentralbl. f. Haut-u. Geschlechtskrankh.*, t. 7, 1923.
- 30 — DUCKERT (R.). — Recherches sur les réactifs organiques susceptibles d'application à l'analyse minérale. La 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone, réactif spécial des cathions de l'antimoine. *Helv. Chim. Acta*, t. 20, p. 362, 1937.
- 31 — DUQUENOIS (P.). — Distinction de l'antimoine trivalent et pentavalent par formation d'iodostibinate d'antipyrine. *C. R. Ac. Sc.*, t. 197, pp. 339, 341, 1933.
- 32 — EARL. OSBORNE. — in LISON *Histochimie animale*. Gauthier-Villars, édit., Paris, 1938.
- 33 — FAUCHON (L.). — Contribution à l'étude du dosage de l'antimoine et de quelques-unes de ses réactions. *Thèse doct. univ. pharm.*, Marseille, 1937.
- 34 — FEIGL (F.). — *Z. Anal. Chem.*, t. 65, p. 448, 1924 et t. 64, p. 42, 1924.
- 35 — FEIGL (F.) et NEUBER (F.). — *Z. anal. Chem.*, t. 62, p. 381, 1923.
- 36 — FORMULAIRE PHARMACEUTIQUE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE, *Imprimerie Nationale*, Paris.
- 36<sup>1</sup> — GAILLIARD (P.). — Sur la technique du microdosage en histospectrographie. *Bull. hist. appl.*, t. 20, pp. 175-188, 6 fig., 1943.
- 37 — GATTERMANN (L.). — *Die Praxis des Organischen Chemikers*. H. Wieland. Ed W. de Gruyter et Co., 1936.

- 38 — GERMUTH (F.-G.) et MITCHELL (C.). — *Am. J. Pharm.*, t. 101, p. 46, 1924.
- 38<sup>1</sup> — GRANEL (Fr.). — Thymocytes et lymphocytes. *C. R. Soc. sc. méd. et biol. de Montpellier et du Languedoc méditerranéen*, 7 juillet 1944, in *Montpellier Médical*, 3<sup>e</sup> série, t. 25-26, 1944.
- 39 — GUTZEIT (G.) et WEIBEL (R.). — Sur l'emploi du réactif antipyrine iodure dans l'analyse à la touche. *C. R. Soc. Phys. et Hist. nat. Genève*, t. 51, p. 33, 1934, et *Arch. sc. Phys.*, t. 16, p. 2471, 1935.
- 40 — GUTZEIT (G.), WEIBEL (R.) et DUCKERT (R.). — Sur une nouvelle réaction spécifique des cations de l'antimoine. *C. R. Soc. Phys. et hist. nat. de Genève*, t. 51, n° 2, pp. 62-64, 1934.
- 41 — HÖFLER et WEBER. — Die Wirkung der Äthernarkose auf die Harnstoff permeabilität von Pflanzenzellen, *Jahresber. für. Wis. Bot.*, t. 65, p. 643, 1926.
- 42 — HUGOUNENCO. — *Traité des poisons*, Masson, édit., Paris, 1891.
- 43 — IWAHASHI. — in LISON. *Verh. jap. path. Ges.*, 1927.
- 44 — JUSTUS (J.). — Ueber Arsenvergiftung auf Grund einer mikroschemisch-histologischen Methode. *Derm. Zeitschr.*, t. 12, p. 277, 1905.
- 44<sup>1</sup> — KHAU VAN KIEN (L.) voir CASTEL (17) et TURCHINI (94), (95), (96), (97), 97<sup>1</sup>), (97<sup>2</sup>), (97<sup>3</sup>).
- 45 — KHOUVINE (Y.) et GRÉGOIRE (J.). — Extraction et analyse de l'acide ribonucléique des larves de *Calliphora erythrocephala*. *Trav. Soc. de chim. biol.*, t. 25, pp. 1082-1085), 1943.
- 46 — KHOUVINE (Y.) et GRÉGOIRE (J.). — Étude biochimique de la métamorphose de *Calliphora erythrocephala*. *Bull. Soc. Chim. biol.*, t. 22, pp. 507, 511, 1940.
- 47 — KIKUTH (W.). — *Arch. Schiffs und Tropfers hyg.*, t. 41, p. 728, 1937.
- 48 — KOHN-ABREST (R.). — *Précis de toxicologie*, Doin, édit., Paris, 1934.
- 49 — KORENMANN. — *Pharm. Zentralhalle*, t. 70, p. 71, 1929.
- 50 — LAMARQUE (P.). — L'historadiographie. Principe. Technique. *Bull. hist. appl.*, t. 14, pp. 516, 6 fig., 1937.
- 51 — LANGERON (M.). — *Précis de microscopie*, Masson, édit., Paris, 1942.

- 52 — LEBEAU (P.) et COURTOIS. — *Traité de Pharmacie chimique*. Masson, édit., Paris, 1938.
- 53 — LEULIER (A.), JUVIN (M.) et TETE (H.). — Recherches sur les dérivés antimonisés du thiopropanol sulfonate de sodium. *Journ. pharm. chim.*, t. 15, p. 593, 597, juin 1932.
- 54 — LÉPINE (P.). — in *Union Pharmaceutique*, t. 72, p. 394, 1931.
- 55 — LEVENE (P.-A.). — *Nucleic Acids*, Chemical Catalogy, New-York, 1931.
- 56 — LEVENT (R.). — Le Renouveau de l'antimoine dans les organismes vivants. *Gazette des Hôpitaux*, n° 59, 24 juillet 1935.
- 57 — LIEBERMANN et LINDENBAUM. — Ueber die Condensation des Oxyhydrochinon mit Aldehyden. *Ber. deutsch. Chem. Ges.*, t. 37, p. 1177 et 2731, 1904.
- 58 — LIÉVIN (Mlle M.). — Recherches sur les stilliréactions de l'antimoine. *Thèse doct. Univer. pharm.*, Paris, 1940.
- 59 — LISON (L.). — *Histochimie animale. Méthodes et Problèmes*. Gauthier-Villars, édit., Paris, 1938.
- 60 — MACHEBŒUF (M.). — *Etat des lipides dans la matière vivante*. Actualité scientifique et industrielle. Hermann, édit., Paris, 78 p., 1936.
- 61 — MEMMESHEIMER. — Der histochemische Nachweis von Arsen in der Haut bei Fällen von Salvarsan-Lichen und Salvarsan-Dermatitis und seine Bedeutung für die Pathogenese dieser Erkrankungen. *Dermat. Zeit.*, Liv. 4, 1928.
- 62 — MEITÈS (M.). — Remarques sur la fixation du chondriome de la cellule végétale après action d'une substance apolaire. *Bull. de la Soc. bot. de Fr.*, t. 88, p. 410-413, 1941.
- 63 — MEITÈS (M.). — Action de l'eau benzinée sur la structure de la cellule végétale. (Contribution à l'étude physiologique et chimique de la cellule.) *Bull. de la Soc. bot. de Fr.*, t. 89, pp. 79-87, 1942.
- 63<sup>1</sup> — MEITÈS (M.). — Étude de la pycnose provoquée par les narcotiques, application de la nouvelle réaction nucléale de Turchini, Castel et Kien. *C. R. Soc. Sc. méd. et biol. de Montpellier et du Languedoc méditerranéen*, 5, mai 1944, in *Montpellier Médical*, 2<sup>e</sup> série, t. 25-26, pp. 283-284, 1944.
- 63<sup>2</sup> — MEITÈS (M.). — Action de l'eau et du benzène sur la structure de la cellule végétale (contribution à l'étude physiologique et chimique de la cellule). *Thèse Sc. Montpellier*, 1944, 240 p., 18 fig., 24 pl. et *Mémoires Sect. Sc. Acad. Sc. et Lettres de Montpellier*, 3<sup>e</sup> série, t. 4, 1944.

- 64 — MILIAN et PERRIN. — La stomatite bismuthique. *Bull. de la Soc. franç. des Hôpitaux de Paris*, t. 46, pp. 135-149, 1922.
- 65 — MILLON et LAVERAN. — Permanence de l'antimoine dans l'organisme vivant. *Ann. hyg. publ. et méd. lég.*, t. 36, pp. 221-223, 1846.
- 66 — MILOVIDOV (P.). — Zur Theorie und Technik der Nuclealfärbung. *Protoplasma*, t. 25, pp. 570-597, 1936, t. 31, pp. 246-266, 1938.
- 67 — MOFFAT (M.-R.) et SPIRO (H.). — *Chem. Z.*, t. 51, p. 639, 1907.
- 68 — MOLISCH-UDRANSKY. — In THOMAS (P.). *Manuel de Biochimie animale*. Masson, édit., Paris, 1936.
- 69 — NIGOSI. — *Proc. Indian. Acad. Sc. Sect. A.*, t. 4, pp. 303-309, 1936.
- 70 — NIETZKY (R.). — Ueber die Darstellung von Chinon und Hydroxychinon. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, t. 19, pp. 1467-1469, 28 mai 1886.
- 71 — OGIER, KOHN-ABREST. — *Chimie toxicologique*. Doin, édit., Paris, 1924.
- 72 — OKKELS (H.). — Détection histochimique de l'or et du plomb. *C. R. Soc. de biol.*, t. 102, p. 1089, 1929.
- 73 — OVERTON. — *Studien über die Narkose*. Leipzig, 1901.
- 74 — PARISELLE (H.) et CHIRVANI (F.). — Sur l'émétique de l'acide saccharique. *C. R. Ac. Sc.*, t. 199, pp. 203-205, 1934.
- 75 — PASCAL (P.). — *Traité de Chimie minérale*, t. 4, p. 70. Masson, édit., Paris, 1933.
- 76 — PERLS et VOGEL. — In LANGERON. *Précis de Microscopie*. Masson, édit., Paris, 1942.
- 77 — PINKUS (F.). — Wismutsaum. *Dermatol. Zeitschr.*, t. 42, p. 198, 1924.
- 77<sup>1</sup> — POLICARD (A.) et MOREL (A.). — Application de la spectrographie d'émission aux problèmes histologiques: l'histospectrographie par étincelage direct des coupes. *Bull. hist. appl.*, t. 9, pp. 57-68, 3 fig., 1932.
- 77<sup>2</sup> — POLICARD (A.) et MOREL (A.). — Influence de la qualité de l'étincelle sur les résultats obtenus en histospectrographie. *Bull. hist. appl.*, t. 9, pp. 139-142, 1932.
- 77<sup>3</sup> — POLICARD (A.). — Détection histospectrographique du cuivre renfermé dans le foie normal et pathologique. *Bull. hist. appl.*, t. 10, pp. 94-103, 1 fig., 1933.

- 78 — POLICARD (A.) et BOUCOMONT (J.). — Détection histospectrographique de l'antimoine dans l'organisme après traitement antimonie. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 114, p. 1076, 1933.
- 79 — POLONOWSKY (M.) et LESPAGNOL (A.). — *Elément de Chimie organique biologique*, p. 449. Masson, édit., Paris, 1934.
- 80 — POUCHET. — Localisation et dissémination de l'antimoine dans l'organisme. *C. R. Ac. Sc.*, 30 septembre 1901 et *Ann. Hyg. publ. et Méd. lég.*, t. 133, pp. 412-414, 1901.
- 81 — QUINCK. — In LISON, *Histochimie animale*. Méthodes et problèmes. Gauthier-Villars, édit., Paris, 1938.
- 82 — REIMER (K.) et TIEMANN (Ferd.). — Ueber die Einwirkung von Chloroform auf Phenole und besonders aromatische Oxy Säuren in alkalischer Lösung. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, t. 9, pp. 1268-1278, 1876.
- 83 — RICHTER (V. von). — *Chimie organique*. Traduit par H. Gault. Gauthier-Villars, édit., Paris, 1930, et Ch. Béranger, édit., Paris, 1910.
- 84 — ROGER ADAMS et DREGER (E.). — *Synthèse organique*, p. 440, Masson, édit., Paris, 1935.
- 85 — SIMONNET (M.). — Contribution à l'étude histophysiologique de l'élimination des sels de mercure. *C. R. Ass. des Anat.*, XXV<sup>e</sup> Réunion, Amsterdam, pp. 283-284, 1930.
- 86 — SWADJIAN. — *La chimie des produits pharmaceutiques*. Gauthier-Villars, édit., Paris, 1936-1939.
- 87 — SYNTHÈSE ORGANIQUE. Quinone. Traduction française présentée par le Chanoine Palfray, Mme et M. Trefouel et E. Fourneau, p. 440, Masson, édit., Paris, 1939.
- 88 — TAYAU (F.). — Sur l'état du cholestérol dans le sérum sanguin. Destruction des cénapses cholestéro-protéidiques par les saponosides. *C. R. Ac. Sc.*, t. 212, p. 575, 1941.
- 89 — THOMAS (P.). — *Manuel de Biochimie*. Masson, édit., Paris, 1936.
- 90 — THIELE (J.). — Ueber die Einwirkung von essigsäure Anhydrid auf Chinon und auf Dibenzoyl styrol. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, t. 31, p. 1247, 1898.
- 91 — TOUGARINOFF (B.). — *Les réactifs organiques dans l'analyse qualitative minérale*. Soc. Sc. Louvain et Presses Univ., édit., Paris, 1930.
- 92 — TURCHINI (J.). — L'avenir de la recherche histologique. Discours de réception à l'Acad. des Sc. et Let. Montpellier in *Languedoc Médical*, t. 11, pp. 214-219, n<sup>o</sup> 7, 1928.
- 93 — TURCHINI (J.). — L'historadiographie. Applications. *Bull. hist. appl.*, t. 14, pp. 17-28, 2 pl. 1937.

- 94 — TURCHINI (J.), CASTEL (P.) et KHAU VAN KIEN. — Une nouvelle coloration nucléaire. Coloration cytologique des noyaux par une fluorone. *C. R. Soc. sc. méd. et biol. de Montpellier et du Languedoc méditerranéen*, 7 mai 1943, in *Montpellier Médical*, 3<sup>e</sup> série, t. 23-24, pp. 440-441, 1943.
- 95 — TURCHINI (J.), CASTEL (P.) et KHAU VAN KIEN. — De quelques colorations nucléaires par des fluorones et leur rapprochement avec la réaction nucléale de Feulgen pour la distinction des acides thymo et zymo-nucléique. *C. R. Soc. sc. méd. et biol. de Montpellier et du Languedoc méditerranéen*, 2 juillet 1943, in *Montpellier Médical*, 3<sup>e</sup> série, t. 23-24, pp. 599-600, 1943.
- 96 — TURCHINI (J.), CASTEL (P.) et KHAU VAN KIEN. — Contribution à l'étude de l'action des fluorones sur les acides nucléiques cellulaires et sur quelques sucres. *Trav. Soc. chim. biol.* t. 25, pp. 1329-1335, 1943.
- 97 — TURCHINI (J.), CASTEL (P.) et KHAU VAN KIEN. — Contribution à l'étude histochimique de la cellule. Une nouvelle réaction nucléale. *Bull. hist. appl.*, t. 21, pp. 124-127, 1944.
- 97<sup>1</sup> — TURCHINI (J.), CASTEL (P.) et KHAU VAN KIEN (L.). — Colorations histologiques par des laques ferriques aux fluorones. *C. R. Soc. sc. méd. et biol. de Montpellier et du Languedoc méditerranéen*, 5 mai 1944, in *Montpellier Médical*, 3<sup>e</sup> série t. 25-26, p. 285, 1944.
- 97<sup>2</sup> — TURCHINI (J.), CASTEL (P.) et KHAU VAN KIEN (L.). — Tuberculine et fluorones. *Bull. Ac. Sc. et Let. de Montpellier*, t. 74, 3 juillet 1944.
- 97<sup>3</sup> — TURCHINI (J.), CASTEL (P.) et KHAU VAN KIEN (L.). — Réactions nucléales et structure du noyau. *C. R. Soc. sc. méd. et biol. de Montpellier et du Languedoc méditerranéen*, 7 juillet 1944, in *Montpellier Médical*, 3<sup>e</sup> série, t. 25-26, 1 pl., 1944.
- 98 — VIALLETON (L.). — *Précis de technique histologique*. Doin, édit., Paris, 1908.
- 99 — WEISE (H.). — Important pharmaceutical aspect of Solustibosan. *Chinesè Méd. J.*, t. 52, pp. 421-424, 1937.
- 100 — WENGER (P.), DUCKERT (R.) et BLANCPAIN (C.-P.). — Recherches sur les réactifs organiques susceptibles d'application à l'analyse minérale. La 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone, réactif spécifique des cations de l'antimoine. *Helv. chim. acta.*, t. 20, pp. 1427-1445, 1935.

## TABLE DES MATIÈRES

|                    |   |
|--------------------|---|
| Introduction ..... | I |
|--------------------|---|

### PREMIÈRE PARTIE

#### DE QUELQUES FLUORONES

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| I. — PRÉPARATION DES FLUORONES .....                            | 8  |
| Préparation de la quinone .....                                 | 9  |
| Préparation du triacétate d'oxyhydroquinone .....               | 12 |
| Préparation de la 9 méthyl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone..    | 13 |
| Préparation de la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone...   | 14 |
| Préparation de la 9 phényl, 2, 3, 7, 2' tétraoxy, 6 fluorone... | 16 |
| Préparation de la 9 phényl, 2, 3, 7, 3' 4' pentaoxy, 6 fluorone | 17 |
| II. — DÉRIVÉ SECONDAIRE DE LA CONDENSATION .....                | 18 |
| le 2, 3 dioxy xantène .....                                     | 18 |

### DEUXIÈME PARTIE

#### ÉTUDE DES RÉACTIONS DE QUELQUES FLUORONES ET EN PARTICULIER DE LA 9 PHÉNYL, 2, 3, 7 TRIHYDROXY, 6 FLUORONE

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. — RÉACTIONS SUR DES SUBSTANCES MINÉRALES .....                                                                                                        | 19 |
| A. — Étude qualitative de la réaction fluorone-antimoine....                                                                                             | 20 |
| Sensibilité du réactif de 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy,<br>6 fluorone .....                                                                              | 20 |
| B. — Spécificité du réactif de 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy,<br>6 fluorone .....                                                                         | 21 |
| Discussion des résultats obtenus avec les cations et les<br>anions .....                                                                                 | 24 |
| Conclusions .....                                                                                                                                        | 26 |
| C. — Étude quantitative de la réaction fluorone-antimoine et<br>dosage pondéral de l'antimoine par la 9 phényl, 2, 3, 7 tri-<br>hydroxy, 6 fluorone..... | 27 |
| Principes - technique - Résultats .....                                                                                                                  | 28 |

|                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II. — RÉACTIONS SUR LES SUBSTANCES ORGANIQUES.....                                                                                                                     | 31 |
| A. — Nouvelle coloration nucléaire par les fluorones et possibilité d'une réaction nucléale analogue à celle de Feulgen .....                                          | 31 |
| Réaction nucléale avec la 9 méthyl 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone.....                                                                                                 | 32 |
| Réaction nucléale avec la 9 phényl, 2, 3, 7 trihydroxy, 6 fluorone .....                                                                                               | 33 |
| Réaction nucléale avec la 9 phényl, 2, 3, 7, 2' tétraoxy, 6 fluorone .....                                                                                             | 34 |
| Réaction nucléale avec la 9 phényl, 2, 3, 7, 3', 4' pentaoxy, 6 fluorone .....                                                                                         | 34 |
| B. — Coloration nucléaire par les laques ferriques de fluorone, coloration par formation de laque ferrique avec la 9 phényl, 2, 3, 7, 3', 4' pentaoxy, 6 fluorone..... | 35 |
| C. — Étude de l'action des fluorones sur les acides nucléiques cellulaires et sur quelques sucres .....                                                                | 36 |
| 1° Résultats obtenus sur les coupes histologiques.....                                                                                                                 | 36 |
| a) Réaction sur le cytoplasme .....                                                                                                                                    | 36 |
| b) Réaction sur le noyau.....                                                                                                                                          | 37 |
| 2° Résultats obtenus sur les acides nucléiques .....                                                                                                                   | 42 |
| a) Expérience sur papier filtre .....                                                                                                                                  | 42 |
| b) Expérience en tube à essai .....                                                                                                                                    | 43 |
| 3° Résultats obtenus avec les sucres .....                                                                                                                             | 44 |
| 4° Essai d'interprétation des résultats .....                                                                                                                          | 45 |

### TROISIÈME PARTIE

#### APPLICATION DES FLUORONES A LA LOCALISATION HISTOCHIMIQUE DES MÉDICAMENTS ANTIMOINIÉS INJECTÉS DANS L'ORGANISME

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. — EFFETS DE L'ANTIMOINE DANS L'ORGANISME.....                             | 51 |
| 1° Préparation des animaux .....                                             | 52 |
| 2° Symptômes observés au cours de la médication avec l'émétique .....        | 54 |
| 3° Lésions anatomiques et modifications fonctionnelles.....                  | 55 |
| 4° Élimination de l'antimoine de l'organisme .....                           | 56 |
| 5° Aperçu histologique de l'action de l'antimoine sur quelques organes ..... | 57 |
| II. — LES RÉACTIFS DE L'ANTIMOINE .....                                      | 61 |
| 1° Généralités .....                                                         | 61 |
| 2° Réactifs histochimiques de l'antimoine.....                               | 65 |
| Qualité à exiger d'une réaction histochimique .....                          | 65 |
| Étude critique de ces réactifs et choix.....                                 | 67 |

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| III. — LOCALISATION HISTOCHIMIQUE DES MÉDICAMENTS ANTI-MONIÉS INJECTÉS DANS L'ORGANISME ..... | 72 |
| 1 <sup>o</sup> Généralités .....                                                              | 72 |
| 2 <sup>o</sup> Établissements de la technique .....                                           | 76 |
| Technique rapide .....                                                                        | 79 |
| Technique à la paraffine .....                                                                | 80 |
| 3 <sup>o</sup> Résultats de nos observations histologiques.....                               | 81 |
| 4 <sup>o</sup> Discussion des résultats obtenus.....                                          | 85 |
| CONCLUSIONS .....                                                                             | 89 |
| Bibliographie .....                                                                           | 91 |
| Table des matières.....                                                                       | 99 |



## DEUXIÈME THÈSE

proposée par la Faculté

---

La Médication antimoniée  
(État actuel)

En ma qualité de Censeur de tour,  
j'ai lu la Thèse ayant pour titre :

*De Quelques Fluorones*  
*Leurs propriétés chimiques et biologiques*  
*leur application à la localisation des*  
*médicaments antimoniés dans l'organisme*  
par M. Louis KHAU VAN KIEN

Je pense que la Faculté peut en  
permettre l'impression.

Montpellier, le 23 Janvier 1945.

*Le Professeur :*

ASTRUC.

VU :

Montpellier, le 23 Janvier 1945,

*Le Doyen :*

ASTRUC.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

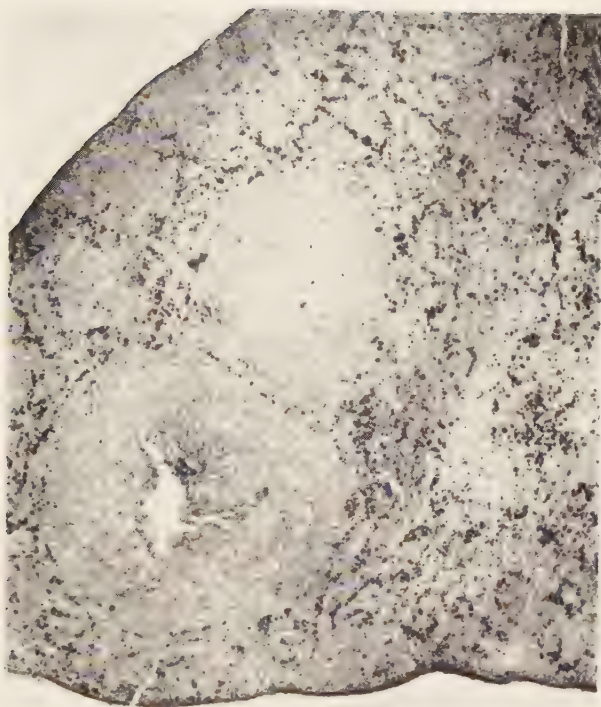
Montpellier, le 2 Février 1945.

*Le Recteur :*

Pour le Recteur,

*Le Doyen délégué :*

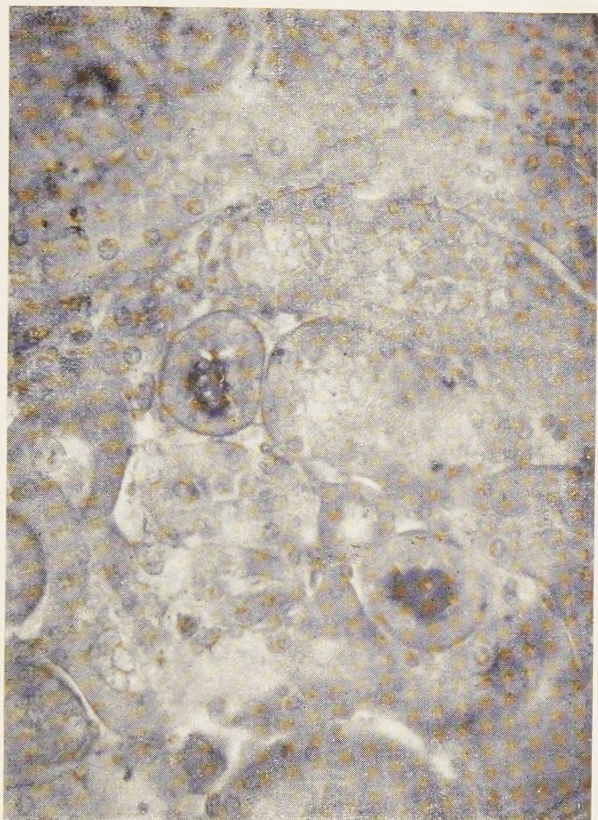
P. MATHIAS.



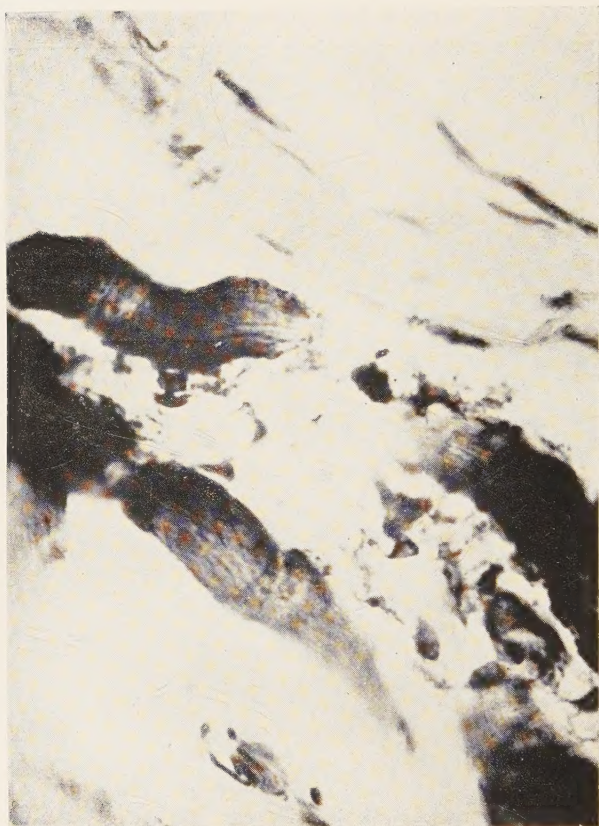
*Fig. 1.* — RATE DE COBAYE. — Après injection sous-cutanée d'émétique (intoxication aiguë), fixation aux vapeurs de formol, coupe à la congélation, traitement au réactif à la fluorone, coloration légère à l'hématéine ( $\times 35$ ). Dépôt d'antimoine dans la pulpe rouge.



*Fig. 4.* — FOIE DE COBAYE. — Injection sous-cutanée d'émétique (intoxication aiguë). Fixation aux vapeurs de formol, coupe à la congélation, réaction à la fluorone. Coloration à l'hématéine ( $\times 200$ ). Dépôt de l'antimoine dans l'endothélium de la veine centro-lobulaire et dans les cellules de Kupffer. Pas d'antimoine dans le parenchyme hépatique.



— *Fig. 5.* — REIN DE COBAYE. — Injection sous-cutanée d'émétique, (intoxication aiguë). Fixation aux vapeurs de formol, réaction à la fluorone, coupe à la congélation, coloration légère à l'hématéine ( $\times 1200$ ). Dépôts d'antimoine dans les tubes contournés, dans la partie apicale et dans la zone des bordures en brosse.



*Fig. 8.* — MUSCLE DE COBAYE. — Injection sous-cutanée d'émétique. (Intoxication chronique de 32 jours). Fixation aux vapeurs de formol. Réaction à la fluorone. Inclusion à la paraffine. Coloration à l'hématoxyline au fer. ( $\times 1000$ ). Dépôt d'antimoine dans le muscle, sous forme de grains en chaînette délimitant les myofibrilles.



